



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

PRODUÇÃO DE RAÇÃO CONTENDO NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS
ESSENCIAIS ENRIQUECIDOS COM VITAMINAS C, D e E, CÁLCIO E FÓSFORO
COMO ADITIVO ALIMENTAR PARA PEIXES COMO TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*)

ESTER INÁCIO DAMIÃO QUINOVA

RECIFE – PE
2020

ESTER INÁCIO DAMIÃO QUINOVA

PRODUÇÃO DE RAÇÃO CONTENDO NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS
ESSENCIAIS ENRIQUECIDOS COM VITAMINAS C, D e E, CÁLCIO E FÓSFORO
COMO ADITIVO ALIMENTAR PARA PEIXES COMO TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*)

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

RECIFE – PE
2020

ESTER INÁCIO DAMIÃO QUINOVA

PRODUÇÃO DE RAÇÃO CONTENDO NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS
ESSENCIAIS ENRIQUECIDOS COM VITAMINAS C, D e E, CÁLCIO E FÓSFORO
COMO ADITIVO ALIMENTAR PARA PEIXES COMO TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*)

Data da Defesa:

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena – UFRPE (Orientador)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza (1° Titular)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Profa. Dra. Maria Adélia Borstelmann de Oliveira (2° Titular)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Quinova e Isabel, e aos meus irmãos pelo amor, compreensão e incentivo a mim dedicados, com amor dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, saúde e força para enfrentar todas as batalhas, até aqui me ajudou o Senhor – Ebenezer!

Ao meu orientador, Prof. Pabyton Gonçalves Cadena, obrigado por me mostrar o caminho da ciência, por tudo que aprendi, pela paciência, pelo apoio e confiança em mim. Excelente professor, orientador, um exemplo a seguir.

Aos meus pais Quinova e Isabel por me darem a vida, pelo cuidado e amor, por tudo que aprendi com vocês, por tudo que fizeram e ainda fazem por mim, obrigado por estarem sempre ao meu lado me apoiando em tudo.

Aos meus irmãos, Helena, Délcia e Alvina, Silvino, Nela e Jarica *in memorial*, obrigada por serem meus irmãos e contribuírem com esta fase da minha vida que hoje estou terminando. Obrigada pela força, carinho e amor de vocês.

Ao Ornelos Madeira, meu eterno namorado, obrigado pelo teu amor e por não desistir de mim, mesmo distante, porém sempre perto, nunca deixou de acreditar em mim, sempre incentivando a ir em frente na constante busca pelo conhecimento.

A todos os professores dos programas de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Biociência Animal e Química da UFRPE, que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários da UFRPE, a Taciana, obrigado pela paciência que tiveram comigo nesse período de pandemia.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

A empresa Piscicultura Vale da Mina, pelo fornecimento das larvas.

Aos meus amigos e companheiros do laboratório, obrigado pelo carinho desde a minha 1ª entrada no LECA, foram muito receptivos e amorosos, me ajudaram em tudo, em especial a Amanda, minha amiga que esteve comigo lado-a-lado incansavelmente durante o projecto até a dissertação.

Aos meus conterrâneos, e amigos de Moçambique, Mira, Mugabe, Teófilo e Adriano, obrigado pela força e amizade de vocês.

EPÍGRAFE

"Não esteja ansioso e nem preocupado, pois não perdi o controle da tua vida, está tudo no Meu tempo, não há nada atrasado, Eu sou teu Deus, Deus proverá". Salmos 46:10"

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Piscicultura no Brasil.....	17
2.2 Tilapicultura Brasileira	19
2.3 Nutrição e Alimentação de peixes.....	21
2.3.1. Vitamina C (Ácido ascórbico).....	23
2.3.2 Vitamina D.....	24
2.3.3 Vitamina E (α - Tocoferol).....	24
2.3.4 Cálcio.....	25
2.3.5 Fósforo	25
2.4 Sistemas de Liberação Controlada (SLC).....	26
2.4.1 Emulsões.....	27
2.5 Óleos Essenciais (OEs).....	29
2.5.1 Óleos Essenciais (OEs) em Produção Animal.....	29
2.5.2 Óleos essenciais (OEs) em Piscicultura	30
2.5.3 Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> (Árvore de chá/Tea tree).....	30
2.5.4 Óleo essencial de <i>Citrus aurantium</i> (Laranja Lima).....	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Geral.....	33

3.2 Específicos.....	33
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
5. CAPÍTULO I – PATENTE.....	41
6. CAPÍTULO II - ARTIGO ADITIVO ALIMENTAR.....	69
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
8. APÊNDICES – PRODUÇÕES	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes utilizados na produção das nanoemulsões.....	91
Tabela 2. Nutrientes da ração.....	91
Tabela 3. Etograma modificado de Silva et al. (2018), dos alevinos de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	92
Tabela 4. Composição química dos óleos essenciais de <i>Melaleuca alternifolia</i> e <i>Citrus aurantium</i> var. <i>Dulci</i>	93
Tabela 5. Eventos comportamentais de tilápia-do-Nilo durante 30 dias experimentais.....	94
Tabela 6. Parâmetros zootécnicos: Ganho de Comprimento GC (cm) Ganho de Peso GP (g), Taxa de Crescimento Específico TCE (%), Taxa de Conversão Alimentar (TCA) e Sobrevivência S (%) de tilápia-do-Nilo expostos a níveis crescentes de emulsões durante 30 dias.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figuras referentes a patente

Figura 1. Análise do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* utilizando o zetazine65

Figura 2. Análise do óleo essencial de *Citrus aurantium* utilizando o zetazine65

Figura referente ao artigo

Figura 1. Cromatograma dos óleos essenciais das cascas de *Citrus aurantium* e *Melaleuca alternifolia*.....91

RESUMO

A piscicultura é uma atividade do setor agropecuário desenvolvida mundialmente em vários países, se destacando por altos níveis de produção de peixe como fonte de proteína animal para o consumo humano. Um dos fatores considerado importante para o sucesso desta atividade é o manejo nutricional, com uso de rações balanceadas ricas em vitaminas e minerais para o melhor crescimento. Todavia, alguns nutrientes por serem hidrossolúveis como a vitamina C e o fósforo, dificultam o máximo aproveitamento pelos peixes desperdiçando a ração e aumentando o custo de produção. Diante disso, a nanotecnologia é uma ferramenta eficaz para amenizar este impasse, usando nanoemulsões preparadas com óleos essenciais (OEs), para incorporar vitaminas e minerais na ração, oferecendo proteção, estabilidade e biodisponibilidade. OEs são compostos fitogênicos e biodegradáveis, com propriedades benéficas, podendo ser utilizado com segurança pois não representam perigo à saúde animal, humana e ao meio ambiente. O presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de produzir um aditivo alimentar contendo nanoemulsões simples água/óleo essencial (A/OE) enriquecidos com vitaminas C, D e E, e minerais Cálcio e Fósforo para peixes como tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Foram utilizados OEs de *Melaleuca alternifolia* (M) e *Citrus aurantium* (C) isolados. Foram realizadas triagens dos níveis de cada componente da emulsão, avaliação das características organolépticas e físico-químicas para definir a melhor nanoemulsão. Foi realizado teste de palatabilidade e testes experimentais com 10 grupos de alevinos de tilápia, sendo o grupo controle G0 com 0,0 g, M1, M2, M3, C1, C2, C3, M1C1, M2C2, e M3C3, com 0,5, 0,75 e 1,0 g de OE respectivamente, para 5 g de emulsão e 50 g de ração. Foi avaliado o comportamento e parâmetros zootécnicos dos animais. Foi possível produzir nanoemulsões com tamanho nanométrico ($105,1 \pm 2,1$ para C a $222,6 \pm 2,0$ nm para M), estáveis e demonstrada a sua palatabilidade quando adicionada à ração para peixes como tilápia com 100% de consumo pelos animais. Também foi depositado um pedido de patente. Eventos comportamentais não foram significativos em todos os grupos ($p > 0,05$) comparado ao G0, indicando que dietas suplementadas com OEs não revelaram efeitos tóxicos aos peixes nas condições formuladas. Ganho de comprimento, ganho de peso, taxa

de crescimento específico e taxa de conversão alimentar também não foram representativos em grupos tratados comparado ao G0 ($p > 0,05$). A taxa de sobrevivência foi maior em C3 comparado ao G0 e aos demais. Diante disto, conclui-se que foi possível produzir um aditivo alimentar palatável contendo nanoemulsão à base de OEs enriquecidos com vitaminas C, D e E, e minerais Cálcio e fósforo, para peixes como tilápia com possível uso em escala industrial.

Palavras-Chave: Nutrição Animal, Nanotecnologia, Compostos Fitogênicos Aquicultura.

ABSTRACT

Fish farming is an activity of the agricultural sector developed worldwide in several countries, standing out for high levels of fish production as a source of animal protein for human consumption. One of the factors considered important for the success of this activity is nutritional management, with the use of balanced diets rich in vitamins and minerals for the best growth of the fish. However, some nutrients, as they are water-soluble, such as vitamin C and phosphorus, hinder maximum use by fish, wasting the feed and increasing the production cost. Nanotechnology is an effective tool to overcome these limitations, using nanoemulsions prepared with essential oils (EOs), to incorporate vitamins and minerals in the feed, offering protection, stability, and bioavailability. EOs had phytochemical and biodegradable compounds, with beneficial properties, which can be used safely because they do not represent a danger to animals, human health, or the environment. In this context, the present work was developed to produce a food additive containing water/essential oil (W/EO) nanoemulsions containing vitamins C, D, and E, and minerals as calcium and phosphorus for fish like Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Melaleuca alternifolia* (M) and *Citrus aurantium* (C) EOs were used. Screenings of the levels of each component of the emulsion, evaluation of the organoleptic, and physicochemical characteristics to define the best nanoemulsion were carried out. Palatability test and an experimental test with 10 groups of tilapia fry were performed, being the control group G0 with 0,0 g , M1, M2, M3, C1, C2, C3, M1C1, M2C2, and M3C3, with 0.5, 0.75, and 1.0 g of OE respectively, for 5 g of emulsion and 50 g of feed. The behavior and zootechnical parameters of the animals were evaluated. It was possible to produce nanoemulsions with nanometric size (105.1 ± 2.1 for C, and 222.6 ± 2.0 nm for M) stable, and demonstrated their palatability when added to the diet for fish like tilapia with 100% consumption by the animals. A patent application has also been filed. Behavioral events were not significant in all groups ($p > 0.05$) compared to G0, indicating that diets supplemented with EOs did not reveal toxic effects to fish in the experimental conditions. Length gain, weight gain, specific growth rate, and feed conversion rate were also not representative in treated groups compared to G0 ($p > 0.05$). The survival rate was higher in C3 compared to G0 and the others. It is

concluded that it was possible to produce a palatable food additive containing nanoemulsion based on EOs containing vitamins C, D, and E, and minerals calcium and phosphorus, for tilapia with possible use on an industrial scale.

Keywords: Animal Nutrition, Nanotechnology, Phytogetic Compounds, Aquaculture

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura é uma das importantes actividades do setor agro-pecuário desenvolvida em vários países a nível mundial, se destacando por altos níveis de produção de peixe como fonte de proteína animal para o consumo humano (PEIXE BR, 2019). Assim sendo, os produtores utilizam os diferentes sistemas de produção para alcançar a máxima produtividade de forma viável, económica e sustentável, para obtenção de peixes de ótima qualidade para atender a demanda do mercado. Tal aumento, requer a utilização de rações balanceadas principalmente em sistemas intensivos onde há restrição de alimento natural incapaz de atender as exigências nutricionais (KUBITZA, 2011).

Com essa intensificação tornou-se necessária, pesquisas relacionadas à alimentação e nutrição para elevar o desempenho dos peixes. As vitaminas (C, D, E) e os minerais cálcio e fósforo (Ca, P), nutrientes comumente utilizados na produção de ração animal, são importantes para otimização do desempenho zootécnico, pois animais nutridos são resistentes à doenças oportunistas. A ausência destes, interfere diretamente na vida dos peixes levando a desnutrição, baixa imunidade e deformações no corpo (ROCHA, 2016).

Todavia, a solubilidade de alguns desses nutrientes como a vitamina C e o fósforo, impossibilita o seu máximo aproveitamento, levando ao aumento no desperdício da ração e no custo de produção (TOYAMA et al. 2000). Ainda, o fósforo é o mineral que mais causa a eutrofização da água, podendo levar à características organolépticas indesejáveis da carne. Assim sendo, estratégias para a utilização de formas mais estáveis, protegidas e menos sujeitas a processo de lixiviação estão sendo desenvolvidas (BOMFIM, 2013).

Com a nanotecnologia, através de sistemas de liberação controlada (SLCs) nanoestruturados é possível amenizar este impasse (THANGARAJ; SEETHALAKSHMI, 2014). Nanoemulsões são SLCs com grande potencial para a encapsulação de princípios ativos. Possuem a capacidade de carreamento de substâncias dando proteção, estabilidade e biodisponibilidade, e liberação no local específico dentro do organismo animal. Apresentam alta capacidade de retenção podendo se manter por longo período no organismo. Não utilizam maiores

quantidades do princípio ativo, levando a redução de possíveis efeitos colaterais (BIZERRA; SILVA, 2016; HILL; LI, 2017; ALENCAR et al. 2018).

Thangaraj; Seethalakshmi (2014), relataram a importância da encapsulação de nutrientes (exemplo da vitamina C) como forma de proteção contra fatores externos, que podem comprometer a sua atividade biológica. As nanoemulsões podem ser produzidas com óleos essenciais (OEs) de plantas, mostrando-se vantajoso pelas suas inúmeras propriedades benéficas no desempenho produtivo e na sobrevivência dos peixes (SUTILI, 2016). Podem ser usados em piscicultura como antifúngicos, antibacterianos, imunostimulantes, em substituição aos antibióticos e outros fármacos que podem perigar tanto a saúde do animal, quanto a do consumidor e o meio ambiente.

Com base nesse contexto, o estudo foi realizado com objetivo de produzir um aditivo alimentar contendo nanoemulsão à base de óleos essenciais enriquecidos com vitaminas C, D e E, Cálcio e Fósforo para uso em criações de peixes como a espécie tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). A partir dessas informações detalhadas foi depositado um pedido de patente, com possível uso em escala industrial, e foi produzido um artigo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Piscicultura no Brasil

A arte de produção de peixes remonta no período da era cristã, durante os impérios egípcio e romano. Desde então, a piscicultura vem se disseminando, mostrando interesse para a comunidade científica e para a população em geral (FARIA et al. 2014).

No Brasil, esta atividade teve início em 1904 com Carlos Botelo, mas os estudos foram intensificados com o pesquisador brasileiro Rodolpho Von Lhering no período de 1927 - 1930. Nessa década começou o seu desenvolvimento com o povoamento de açudes públicos no Nordeste para atender a necessidade das populações circunvizinhas (FARIA et al. 2014).

O sistema utilizado nessa época era extensivo, um modelo de piscicultura popular destinado a produtores de pequena escala que visa incrementar a renda familiar. Os peixes eram mantidos a base de alimentos naturais sem uso de suplementos, resultando em baixo nível de produção e tempo de cultivo relativamente longo (FARIA et al. 2014).

Com o aumento de pesquisas relacionadas com a nutrição e alimentação de peixes, surgiram tecnologias modernas que transformaram o sistema extensivo em intensivo e super-intensivo focados no uso de ração com melhor qualidade nutritiva, para melhorar a saúde e maximizar o crescimento dos peixes (FURUYA, 2013).

O Brasil possui um grande potencial para o desenvolvimento da piscicultura devido as suas condições naturais favoráveis, sendo o maior mercado da América Latina e um dos maiores do mundo, tendo no ano 2014 produzido 578.800 toneladas (t) de peixes (figura 1). Apesar de alguns entraves que limita o crescimento da produção no país, como por exemplo, dificuldades de obter licenças ambientais, falta de políticas específicas para o desenvolvimento do setor, dificuldades no acesso ao crédito, alto custo de produção, tecnologias pouco disponíveis e a crise hídrica que atingiu a região nordestina, a piscicultura no país continua crescendo e aumentando a sua produtividade, tendo no ano 2015 alcançado 638.000 t. Com incremento de 1% em 2016, totalizando 640.510 t. Em 2017, a piscicultura cresceu em 8% do PIB tendo terminado o ano com uma produção de 691.700 t (figura 1) (PEIXE BR, 2019). O aumento foi possível graças a 3 estados da região sul, o Paraná, a Santa Catarina

e o Rio Grande do Sul que contribuíram com mais de 24.500 t, levando a região a alcançar nesse ano 178.500 t. A região Centro-Oeste ficou na terceira posição com 122.000 t. A região do semiárido nordestino foi definida como área estratégica para gestão sustentável pois é uma região que possui problemas de escassez hídrica (PEIXE BR, 2019).

A tilápia teve maior produção entre as espécies de água doce cultivadas no Brasil em 2018, representando 55,4% da produção, isto é, aproximadamente 400.280 t de um total de 722.560 t (figura 1), tendo um aumento de 11,9% de produção em relação ao ano anterior 2017 (PEIXE BR, 2019). Ela continua liderando as demais, e em 2019 a produção atingiu 758.006 t, representando um aumento de 4,9 % comparativamente ao ano anterior e representando 57% de toda a piscicultura (PEIXE BR, 2020).

Nacionalmente, o estado pernambucano possui um crescimento progressivo em piscicultura, apesar da falta de organização e estruturação da cadeia produtiva (PEIXE BR, 2019). O estado é liderado por duas regiões potenciais em produção de peixes de cultivo, a região da Mata Sul caracterizada por um ambiente húmido devido a muitos rios e riachos, com sistemas de viveiros escavados, e a região do sertão do rio São Francisco com grandes barragens de Moxotó e Itaparica, baseado em sistema de tanques-redes de alta produção intensiva. Esta região, é considerada um dos maiores pólos de piscicultura do nordeste de Pernambuco que abrange Petrolândia, Jatobá, Itacuruba, Belém do São Francisco e Floresta, onde atuam pequenos e médios produtores, porém, os maiores destacam-se a Pesca Nova e a Netuno, que possuem infraestruturas próprias de produção de alevinos e beneficiamento do pescado. Dados do Peixe BR, 2019, prevê até o ano 2025, uma produção mundial de 100 milhões de toneladas de peixes cultivados.

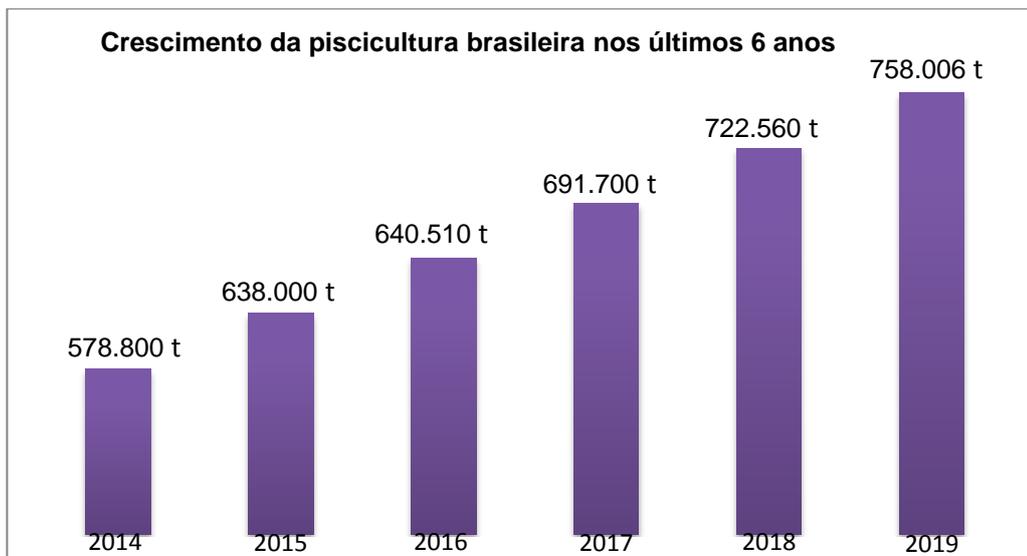


Figura 1. Crescimento da piscicultura brasileira nos últimos 6 anos

Fonte: Adaptado do Peixe BR, 2019, 2020.

2.2 Tilapicultura Brasileira

Brasil possui diversas espécies de peixes, tanto nativas quanto exóticas com alto potencial para a piscicultura. Entre as exóticas, está a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758), que conquistou o país convertendo - se em uma espécie importante tanto para o Brasil, quanto para o mundo no geral pela facilidade na adaptação em diferentes condições de cultivo e suas características positivas como rusticidade e alto índice de produtividade (SEBRAE, 2015).

A tilápia nilótica também conhecida como "frango aquático" (devido ao seu sabor delicioso semelhante ao frango), é uma espécie de água doce, nativa do continente africano (delta do rio Nilo) e pertencente a família *Chichilidae*. Ela cresce mais em cativeiro, sendo amplamente disseminada em diversos países das regiões tropicais e subtropicais, chegando a ser a primeira cultivada no Brasil e a segunda no mundo perdendo somente para carpas, (IBGE, 2015).

Foi introduzida no país juntamente com a tilápia de Zanzibar (*Oreochromis shornorum*) pelo Departamento Nacional de Obras Contra a Secas (DNOCSs) na década de 1970, objetivando a produção de alevinos para povoamento dos reservatórios públicos da região nordeste e para o fomento de cultivo (VIDAL, 2016). Ganhou importância a partir da década de 90, e sua faixa de temperatura em torno

de 26 a 30 °C facilitou a expansão do cultivo para muitas regiões como o nordeste, sudeste e o sul do país (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2017).

Desde então, a tilapicultura é praticada em quase todos os estados do Brasil, sendo 5 como os maiores produtores representando 70,5% da produção total, tendo o Paraná como o principal produtor com 105.392 t em 2017. Em 2018, o estado ocupou 1ª posição com 123.000 t, São Paulo a 2ª posição com 69.500 t, Santa Catarina a 3ª posição com 33.800 t, Minas Gerais a 4ª posição com 31.500 t e por último a Bahia a 5ª posição com 24.600 t (PEIXE BR, 2019). No ranking de produção de tilápias em 2016, Pernambuco ficou em 17ª posição com 12.000 t e em 15ª posição no ano 2017 com 17.000 t. A produção cresceu, e em 2018 aumentou para 23.470 t com uma variação de 38,1% em relação ao ano anterior. No entanto, em 2019 o estado aparece na lista pela primeira vez entre os cinco maiores produtores deixando de fora a Bahia (PEIXE BR, 2020).

Condições que favorecem o desenvolvimento da piscicultura em Pernambuco, como qualidade da água com grande volume devido às barragens construídas para geração de energia elétrica, níveis ótimos de oxigênio e clima próprio para a criação durante o ano, fazem com que o estado seja uma importante região produtora de peixes. Além disso, a padronização do processo de licenciamento ambiental, elevada oferta de insumos e um grande número de profissionais qualificados pelo curso de Engenharia de Pesca, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, contribuem para o aumento da produção. Com isso, o Brasil consolida-se na 4ª posição entre os maiores produtores de tilápia no mundo, após a China em 1ª posição, a Indonésia na 2ª e o Egito na 3ª posição (PEIXE BR, 2020).

A espécie *Oreochromis niloticus* possui hábito territorialista (briga pelo seu território) e características zootécnicas favoráveis como, facilidade na adaptação às diversas condições de cultivo com baixo custo de produção, aceita alimentos tanto de origem animal quanto de origem vegetal, possui alta prolificidade (capacidade de gerar maior número de alevinos), rusticidade (resistência a doenças, estresse, altas densidades de povoamento e baixo teor de oxigênio dissolvido), tolerância a mudanças de temperatura podendo ser cultivadas entre 15 a 32 °C, porém com um intervalo ideal de 26 a 30 °C (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2017), e também em áreas de alta salinidade (HELUY, 2019). Tem rápido crescimento com um bom

desempenho produtivo, alcançando o peso ideal para a comercialização (600 gramas a 1 quilograma) em intervalo de 4 a 7 meses de cultivo porém dependendo do clima. Este é um dos pontos considerados importantes na produção, pois influencia no metabolismo dos peixes fazendo com que estados mais quentes como o Nordeste (7 meses de cultivo), tenham vantagens em relação aos estados mais frios, como o Sul do país (9 meses de cultivo) (SEBRAE, 2015). Sua carne branca é de boa qualidade, sem espinhas intramusculares em forma de "y", ótimo rendimento de filé apresentando aproximadamente 85% de água em sua composição e com alta aceitação no mercado consumidor (ANDRADE et al. 2015).

Para além da carne, a pele de tilápia-do-Nilo é usada em medicina no tratamento de queimaduras e feridas. Estudos histológicos confirmam a sua utilização como um ótimo curativo pois, possui boa quantidade de colágeno Tipo I, boa resistência à tração, boa umidade semelhante à pele humana, boa aderência da pele na ferida e melhora o processo de cicatrização (FRANCO et al. 2013).

2.3 Nutrição e Alimentação de Peixes

Um dos principais gastos na produção aquícola é com a alimentação, considerada o fator de extrema importância para a vida do animal, podendo chegar em até 70 a 80% do custo total. No entanto, profissionais da área estão cada vez mais buscando cada vez mais alternativas que minimizem os custos e maximizem a produção (ANDRADE et al. 2015).

Com a intensificação da piscicultura tem havido desequilíbrios nutricionais devido ao inadequado enriquecimento vitamínico e mineral nas rações (LIMA; BARBOSA, 2016). Estes nutrientes são importantes para o normal funcionamento de processos biológicos, para formação de tecidos ósseos, sanguíneos e escamas dos peixes. Atuam como cofatores enzimáticos no metabolismo, desempenham funções específicas no equilíbrio ácido-base do sangue, na transmissão dos impulsos nervosos, síntese de metaloproteínas (hemoglobina) e de células de defesa. São imprescindíveis para a manutenção da higidez animal, atuando na integridade da pele, brânquias e mucosa intestinal, no processo de cicatrização e são considerados antioxidantes. A suplementação adequada das vitaminas e sais minerais, é necessária para o aumento do desempenho reprodutivo das matrizes e a qualidade

das larvas e alevinos, maior crescimento animal, melhor conversão alimentar, tolerância à doenças, ao manuseio e transporte vivo, alcance de altas taxas de produtividade, aumento de número de safras anuais e alta digestibilidade contribuindo com a redução do lançamento dos efluentes no meio ambiente (KUBITZA, 2011).

Sais minerais, são compostos inorgânicos essenciais para a vida, usados pelos peixes na formação de tecidos e vários processos metabólicos. Eles diferem de outros nutrientes exigidos, por não serem produzidos pelo organismo, devendo ser adicionados na dieta. Desempenham várias funções biológicas como, estruturais (constituição de tecidos ósseos e proteínas musculares), regulatórias (regulam as reações enzimáticas do organismo) e fisiológicas (mantém o balanço osmótico entre os fluidos corporais e a água, e a permeabilidade da membrana) (SILVA, 2015). Em sistema intensivo, a dieta é a principal fonte desses elementos, no entanto, em ambientes naturais, estes e outros minerais podem ser absorvidos diretamente da água (NRC, 2011).

Vitaminas são moléculas orgânicas importantes na dieta dos peixes e estão envolvidas em 100% nas reações químicas dos mesmos atuando como cofatores ou substratos com funções específicas no processo metabólico celular. A minoria delas são substâncias únicas, a maioria são famílias de substâncias químicas relacionadas, com as mesmas atividades biológicas, estando divididas em hidrossolúveis (solúveis em água) que devem estar presentes na dieta diária e na quantidade correta, pois, por não serem armazenadas o seu excesso é excretado, e lipossolúveis (solúveis em gorduras/óleos) que podem ser estocadas nos tecidos, sendo fornecido em pequena quantidade na dieta (SILVA, 2015).

A deficiência ou ausência de uma determinada vitamina ocasiona uma hipovitaminose, perda de apetite, descoloração da pele, perda de coordenação, estresse, hemorragias, lesões no corpo do animal, aumento de susceptibilidade às infecções bacterianas e aumento na taxa de mortalidade. A falta das lipossolúveis também implica sérias perdas económicas em função da redução do ritmo de crescimento, redução da eficiência alimentar, degeneração das brânquias e hipertrofia (NAVARRO et al. 2009).

Cada espécie de peixe apresenta uma necessidade quantitativa diferente de cada fonte nutricional. Essa diferença de necessidades em vitaminas entre as diferentes espécies de peixe ocorre porque algumas espécies sintetizam certas vitaminas e outras não, também, porque cada espécie tem uma resposta diferente a uma determinada quantidade de vitamina (NAVARRO et al. 2009).

A exigência das vitaminas por tilápias cultivadas em sistemas extensivos, é suprida parcial ou totalmente por alimentos naturais presentes na água. No entanto, as cultivadas em sistema intensivo ou semi-intensivo, necessitam do fornecimento de vitaminas na dieta, principalmente na fase inicial de vida pois tem uma maior demanda em relação a fase de engorda. Uma ração completa irá garantir um bom desenvolvimento dos peixes e reduzir o estresse causado pelo manuseio ou altas densidades (SILVA, 2015).

2.3.1. Vitamina C (Ácido ascórbico)

A vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel, das mais estudadas para peixes, pois, tanto estes quanto outros animais não são capazes de sintetizá-la, sendo necessária sua inclusão na dieta. Ela é fundamental especialmente nos estágios iniciais de vida, por apresentar um efeito direto no crescimento, desenvolvimento dos processos digestivos, (ROTTA, 2003; LIU et al. 2011) e por desempenhar um papel importante na formação do Colágeno, componente do esqueleto (TOYAMA et al. 2000). Além de fortificar o sistema imune reduzindo a mortalidade, também atua na manutenção do tecido conectivo, vascular e ósseo, na cicatrização, na síntese protéica e síntese de eritrócitos na corrente sanguínea importante para o transporte de oxigênio e dióxido de carbono (NSONGA et al. 2009).

A vitamina C também ajuda na absorção do ferro evitando anemia microcítica e hipocrômica aos alevinos (BARROS et al. 2002), prevenção do estresse e infecções bacterianas e, juntamente com a vitamina E, minimiza a peroxidação de lípidos nos tecidos (FURUYA, 2013). Ela aumenta a capacidade antioxidante das células pela neutralização dos radicais livres e permite maior sobrevivência dos alevinos (TOYAMA et al. 2000).

A deficiência desta vitamina em peixes pode levar a atrofia muscular, paralisia das nadadeiras dorsal e peitoral (natação errática ou em espiral) falta de

coordenação motora, espasmos musculares, coloração escura, exoftalmia (olhos saltados), crescimento retardado, escoliose, cifose, lordose com escorregamento de vértebras, ascite (barriga d'água), dermatite, hemorragia, convulsão, letargia, perda de escamas, excesso de muco, podendo aumentar o nível de mortalidade (ROTTA, 2003).

2.3.2 Vitamina D

A vitamina D, é uma vitamina lipossolúvel, dividida em dois tipos: D3 (colecalciferol) e D2 (ergocalciferol) convertida em 25-hidroxitamina D3 (prohormônio, calcidiol). É produzida principalmente no fígado, por uma ou mais enzimas, podendo também ser produzida fora do fígado em certas células como enterócitos, que contêm enzimas semelhantes às encontradas no fígado (MENDES, 2000). Esta vitamina é fundamental para o funcionamento normal do organismo, regulação dos níveis de cálcio e fósforo no plasma e nos ossos, evitando a hipercalcemia (MENDES, 2000). É importante para a formação de osteoblastos (células osteoprogenitoras responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea), para o desenvolvimento fetal e função do sistema nervoso, pâncreas e sistema imunológico. Possui também, efeitos anti-inflamatórios, tromborregulatórios, antioxidante, e reduz a taxa de mortalidade (BUIRAGO et al. 2003).

2.3.3 Vitamina E (α -Tocoferol)

A vitamina E, é uma substância lipossolúvel, instável e facilmente oxidável, perdendo maior parte de sua atividade biológica quando está no estado oxidado. Possui maior atividade biológica em comparação a outros compostos, devido a maior índice de absorção intestinal, maior deposição nos tecidos e menor excreção fecal. O acetato de tocoferol não é assimilado diretamente em humanos ou animais, sendo portanto hidrolisado em vitamina E através das enzimas pancreáticas chamadas de colesterol éster hidrolases, presentes no trato gastrointestinal e sendo finalmente absorvidas pela parede intestinal (ALKALADI, 2019). Está presente nas membranas celulares dando proteção contra oxidação de ácidos graxos polinsaturados e do colesterol, atua como antioxidante reduzindo ou inibindo a

produção e ação dos radicais livres, protege os tecidos, influencia o sistema imunológico aumentando as defesas e protege os filés durante o armazenamento. A vitamina E, possui efeitos no desenvolvimento gonadal no período da vitelogênese dos peixes em reprodução, na eclodibilidade dos ovos e na sobrevivência das larvas (IZQUIERDO et al. 2001; NAVARRO et al. 2009).

2.3.4 Cálcio

O cálcio é um dos minerais mais exigidos ou exigidos em elevadas concentrações na dieta animal além do fósforo (RIBEIRO et al. 2006). Possui baixa solubilidade em água, é encontrado em maior parte nos ossos e escamas dos peixes. É importante para a osmorregulação, coagulação sanguínea, funcionamento dos músculos, transmissão dos impulsos nervosos e tem papel importante em várias reações metabólicas (ROCHA, 2016).

Os peixes absorvem o cálcio diretamente da água através do tecido branquial em ambiente natural, porém em regime intensivo ou semi-intensivo é necessário sua inclusão na dieta para satisfazer a demanda nutricional. Além do tecido branquial, o mineral pode ser absorvido através do intestino quando a dieta possui teores adequados de vitamina D3, juntamente com o fósforo, atua no desenvolvimento, reprodução, manutenção do sistema esquelético e estabilidade das vértebras. Sua deficiência acarreta falta de apetite e menor mineralização óssea que irá interferir diretamente no seu crescimento (ROCHA, 2016).

2.3.5 Fósforo

O fósforo é um mineral hidrossolúvel, essencial para o metabolismo energético, crescimento, mineralização óssea e reprodução. Está presente em ácidos nucleicos, fosfolípidos, enzimas, compostos glicolíticos e de alta energia, participando de inúmeros processos essenciais e atua na fosforilação oxidativa. Sinais de sua deficiência no organismo do peixe, inclui a falta de apetite, dificuldades na digestibilidade de lípidos, carboidratos, energia, redução na eficiência alimentar, maior acúmulo de gordura na carcaça, deformação dos ossos da região da cabeça, menor mineralização óssea e conseqüentemente crescimento reduzido (MIRANDA et al. 2000; PEZZATO et al. 2006).

Em ambiente natural, os peixes tem a capacidade de absorver quase 100% de todos minerais necessários para o seu desenvolvimento, com exceção do fósforo que é o mais pesquisado para os peixes (RIBEIRO et al. 2006). A dieta desempenha maior importância do que a água para satisfazer a necessidade dos peixes em fósforo, e quase 90% do nutriente proveniente desta dieta é destinado a constituição dos tecidos de sustentação. Porém, este mineral presente na dieta de origem vegetal é indisponível, por estar na forma de fitato, e os peixes não produzem a enzima fitase. O resto do fósforo e outros nutrientes não absorvidos pelo animal é excretado e perdido na água, podendo causar a eutrofização do meio após a decomposição, levando à características organolépticas indesejáveis da carne do peixe (RIBEIRO et al. 2006).

Alguns desses nutrientes, como a vitamina C e o fósforo, possuem baixa estabilidade por serem hidrossolúveis propiciando grandes perdas pelo processo de lixiviação, e não satisfazendo as necessidades nutricionais dos peixes (THANGARAJ; SEETHALAKSHMI, 2014). Portanto, para proteger qualquer nutriente instável da destruição, é necessário estabilizar antes do consumo pelo animal, porém o processo não deve comprometer a sua atividade biológica. Com isso, o método capaz de estabilizar os componentes funcionais e reduzir a perda de nutrientes na água, aumentando a eficiência de absorção é a nanotecnologia (BOMFIM, 2013). Esta é uma ferramenta multidisciplinar que envolve a criação e utilização de diferentes sistemas em escala manométrica geralmente entre 0,1 e 200 nanômetros (SCHAFFAZICK et al. 2003).

2.4 Sistemas de Liberação Controlada (SLC)

São sistemas nanoestruturados utilizados para o encapsulamento e entrega de substâncias com atividade biológica (BIZERRA; SILVA, 2016). Esses sistemas têm atraído muitos pesquisadores devido a sua ampla utilização na área cosmética (MARZUKI et al. 2019), farmacêutica (JAISWAL et al. 2015), indústria de alimentos (JAMPILEK et al. 2019), medicinal (HORTA, 2015), agrícola (ZHAO et al. 2017) e veterinária (BASTO et al. 2016), como veículos para transporte de princípios ativos (HERNANDES, 2015). Os SLCs, possuem capacidade de carrear uma substância, conduzi-la até o local específico e liberá-la de forma refreada, aumentando deste

modo a eficiência do produto encapsulado, a estabilidade e a sua biodisponibilidade, além disso, utilizam menores quantidades de princípio ativo, podendo reduzir possíveis efeitos colaterais. Apresentam alta capacidade de retenção podendo se manter por tempo prolongado no organismo (SINGH et al. 2017; ALENCAR et al. 2018). Nanoformulações de compostos ativos preparados como transportadores são favoráveis pois garantem não apenas a estabilidade, mas também liberação frequente e controlada de nutrientes (JAMPILEK et al. 2019).

2.4.1 Emulsões

São sistemas heterogêneos resultantes da mistura de dois líquidos imiscíveis entre si (óleo e água), onde um está disperso no outro em forma de vesículas ou gotas. O líquido que contém as gotas dispersas é chamado de fase contínua ou externa, a outra fase é chamada descontínua, interna, ou dispersa. As emulsões simples são classificadas em óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O), dependendo da fase externa, podendo existir ainda emulsões múltiplas água-em-óleo-em-água (A1/O/A2) ou óleo-em-água-em-óleo (O1/A/O2), sendo todas estabilizadas por um ou mais agentes emulsificantes também chamados de tensoativos ou surfactantes (FRANGE; GARCIA, 2009; DALTIM, 2011). Os surfactantes são compostos orgânicos anfipáticos que em sua molécula apresentam uma parte apolar (lipofílica) e outra parte polar ou iônica (hidrofílica), com duas funções básicas, reduzir a tensão interfacial favorecendo a formação da emulsão e, evitar a coalescência entre as gotas da emulsão (TADROS et al. 2004). A presença de surfactantes diminui a força de coesão entre as moléculas do solvente, localizadas na superfície, reduzindo a tensão superficial. A adição de mais moléculas de surfactante após a saturação da superfície entre as duas fases (polar/apolar) não diminuirá a tensão superficial. Os tensoativos são classificados como aniônicos (carga negativa), catiônicos (carga positiva), não iônicos ou anfotéricos (carga positiva e negativa), de acordo com o grupo presente na parte polar (DALTIM, 2011).

Tensoativos não-iônicos apresentam Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (EHL) na faixa de 1 a 20. Este parâmetro é usado para selecionar os surfactantes para as emulsões. O EHL, indica atração simultânea deste em migrar para a interface entre

a fase oleosa e aquosa, para reduzir a tensão interfacial da emulsão. Tensoativos com EHL de 3 a 6 são considerados lipofílicos e produzem emulsões do tipo A/O, e com EHL de 8 a 18 são considerados hidrofílicos e produzem emulsões do tipo O/A, ou seja, pode-se dizer que, quanto menor o valor de EHL, mais hidrofóbico é o agente emulsificante. O polissorbato 80 (Tween 80) e monooleato de sorbitan (Span 80), são surfactantes não aniônicos comumente empregues para a formação de emulsões simples O/A, de uso tópico, oral e parenteral. Possuem boa estabilidade e compatibilidade química, com baixa toxicidade e não são irritantes. Apresentam Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo (EHL) opostos, o Tween 80 com EHL alto (15,0) e o Span 80 com EHL baixo (4,3) (DALTIM, 2011).

As nanoemulsões podem ser utilizadas como SLCs, pois são sistemas bastante promissores desenvolvidos como uma alternativa para a encapsulamento e liberação de princípios ativos, nutrientes e outros produtos (SCHAFFAZICK et al. 2003).

A grande atração das nanoemulsões para aplicação em diferentes áreas, é devido às suas características como, tamanho muito pequeno nano (inferior a 300 nm) com elevada superfície de contato levando a melhoria da sua biodisponibilidade; capacidade de liberação de ativos, sua estabilidade evita coalescência das partículas, tornando-as adequadas para entrega de bioativos (IZQUIERDO, et al. 2002).

As nanoemulsões como transportadores, podem reduzir o problema de solubilidade de nutrientes, pois têm um potencial de estabilização de ativos lipofílicos e hidrofílicos, (FLORES et al. 2013). As nanoemulsões ajudam a proteger substâncias sensíveis à reações adversas como vitaminas, carotenóides, antioxidantes, proteínas e sais minerais, preservando suas propriedades biológicas, características organolépticas e melhorar a palatabilidade dos produtos. Quando armazenadas em condições próprias e adequadas, podem ficar estáveis por longo prazo (PAREDES et al. 2016).

Óleos essenciais (OEs) de plantas podem ser utilizados para produção de nanoemulsões pois, extratos vegetais possuem efeitos benéficos para a saúde humana e animal (CHITMANAT et al. 2005).

2.5 Óleos Essenciais (OEs)

OEs são misturas de compostos naturais lipofílicos, aromáticos e voláteis produzidos pelo metabolismo secundário de tecidos vegetais em resposta a fatores estressantes, com funções fundamentais na proteção e sobrevivência das plantas contra microrganismos como bactérias e parasitas (JANCZYK et al. 2009). Esses compostos ou metabólitos são hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, cumarinas, peróxidos, ácidos orgânicos, óxidos, lactonas, etc. responsáveis pelos sabores e odores agradáveis, e com um composto majoritário farmacologicamente ativo que confere suas propriedades biológicas (FERNANDES et al. 2015).

Os OEs se destacam pela sua boa disponibilidade como um recurso fitoterápico e culinário (BRASIL, 2006), boa biodegradabilidade com menor impacto ambiental, saúde humana e baixa toxicidade (FERREIRA et al. 2011), podendo ser extraídos de partes de vegetais (raízes, caules, folhas, flores, frutos e sementes) através de destilação por arraste a vapor d'água. A sua composição química varia consideravelmente em função das condições climáticas, época de colheita, solo, irrigação, fertilização, origem geográfica, método de extração, espécie, estágio de desenvolvimento da planta e a forma como esse princípio é metabolizado. As plantas possuem um ou mais compostos majoritários, que as conferem suas propriedades biológicas (WINDISCH et al. 2008).

Estudos realizados por pesquisadores, comprovaram a eficácia da utilização de óleos essenciais de plantas como potenciais inseticidas (SIMAS et al. 2015), no combate à resistência bacteriana aos antibióticos (YAP, et al. 2014), no tratamento de patologias de pele (TEDESCO et al. 2014).

2.5.1 Óleos Essenciais (OEs) em Produção Animal

Vários estudos demonstraram a utilização de OEs como de orégano, tomilho, canela, cravo, entre outros, para diversos fins em Produção Animal, pois possuem propriedades semelhantes a antibióticos e outros produtos sintéticos. O uso desses produtos sintéticos tem sido desencorajados nos dias atuais, devido a alta resistência antibacteriana dos microrganismos e o acúmulo de resíduos na carne e no leite, causando problemas para a saúde animal e humana. OEs podem ser

usados na produção de aditivo alimentar para leitões em creche (WEEGE et al. 2019), para frangos e ruminantes (ZENG et al. 2015), atuando como um antimicrobiano, e reduzindo o acúmulo de amônia e a produção de metano entérico. Este último, para além de ser um gás de efeito estufa, é uma perda energética que poderia ser usado para desempenho animal (STELLA et al. 2017). Pode ser usado como substitutos aos antibióticos (OMONINJO et al. 2018), para prevenção e tratamento de várias doenças fúngicas e bacterianas, pois são produtos naturais, biodegradáveis, geralmente sem toxicidade e mais seguros para os animais e o ambiente (ZENG et al. 2015).

2.5.2 Óleos essenciais (OEs) em Piscicultura

Os OEs possuem propriedades extraordinárias e promissoras em diferentes áreas incluindo na piscicultura. Porém apesar de ser pouco estudado, estes, podem ser adicionados em rações servindo como aditivo alimentar imunostimulante e promotor de crescimento em tilápia nilótica (YAP et al. 2014; VALLADÃO, 2018). Outras técnicas de encapsulamento de OEs também podem ser utilizadas, como método convencional de aspersão com pulverizador, spray drying (secagem por pulverização), Spray cooling (resfriamento por spray), coacervação, extrusão, liofilização e emulsificação (DAIRIKI et al. 2013; SILVA et al. 2014). Possuem vantagens de serem substâncias que não causam resistência bacteriana em peixes (VALLADÃO, 2018). Podem ser utilizados como antiparasitários, antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes, antivirais e imunostimulante, principalmente quando adicionados na água. São usados como uma boa alternativa em substituição aos produtos sintéticos que causam problemas para a saúde única (SUTILI, 2016; YILMAZ et al. 2018).

2.5.3 Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Árvore de chá/*Tea tree*)

A *Melaleuca alternifolia* (*Tea tree*) é uma planta pertencente a família *Myrtaceae* e subfamília *Leptospermoideae*, que ocorre principalmente na Malásia, Polinésia e Austrália. É conhecida como árvore de chá (em inglês *tea tree*) pelo fato de suas folhas serem utilizadas para preparar um chá aromático, sendo também utilizadas como anti-séptico para tratamento de variedades de doenças dérmicas

como queimaduras, mordidas de insetos, lacerações e micoses (VIEIRA et al. 2004). Sua principal característica destaca-se a produção de óleos essenciais utilizados em farmácias e fábrica de cosméticos, também são potenciais melíferos (que produz mel) e frutíferos (que produz frutos), sendo os frutos, carnudos e suculentos, indicados para o consumo humano por apresentarem propriedades nutraceuticas graças aos compostos secundários aromáticos, fitoterápicos e antioxidantes presentes nessas plantas. O OE de melaleuca é obtido através da destilação a vapor, das folhas e ramos terminais da planta (PADALIA et al. 2015)

Arthur Penfold, curador do Museu Australiano de Artes e Ciências Aplicadas, obteve pela primeira vez em 1925, o OE de *Melaleuca alternifolia* e avaliou suas propriedades que estão relacionadas com ação antibiótica, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral, bactericida, expectorante, antifúngica, inseticida, antiparasitários, antioxidante cicatrizante, anestésico, imunestimulante e anticancerígena. O valor terapêutico dessas plantas é determinado pela presença majoritária de compostos químicos, como por exemplo, o terpinen-4-ol, o principal componente mais ativo do OE da árvore do chá (SAGAVE et al. 2015).

2.5.4 Óleo essencial de *Citrus aurantium* (Laranja Lima)

O *Citrus aurantium* vulgarmente conhecido como laranja azeda ou amarga (podendo existir variedade *dulci*), pertence à família *Rutaceae* e subfamília *Aurantioideae*, originou-se principalmente das regiões tropicais e subtropicais do sul e sudeste dos continentes asiático e africano, inclusive regiões da Austrália (COSTA et al. 2010).

Assim como a melaleuca, o citrus chegou ao Brasil através dos portugueses durante a colonização e com melhores condições de cultivos, estas plantas se expandiram por todo o país, se tornando um dos principais fornecedores de OEs cítricos (OLIVEIRA et al., 2012). Seus frutos são vulgarmente conhecidos por citrinos, representados por laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limões (*Citrus limon*), limas ácidas, o Tahiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*Citrus aurantifolia*), e doces como a lima da Pérsia (*Citrus limettoides*), o pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja azeda (*Citrus aurantium*) e

toranjas (*Citrus grandis*). São ricos em vitaminas A, complexo B e vitamina C, e sais minerais como cálcio, potássio, sódio, fósforo e ferro (OLIVEIRA et al., 2012).

O citrus é frequentemente utilizado na medicina popular como anti-reumáticos, diuréticos, anti-sépticos do sistema urinário, no tratamento de cistite, uretrite, prostatite, dismenorréia, cólicas, mancha na pele e espinha. Também possuem valor económico no mercado consumidor para produção de sucos industrializados e outros produtos como bagaços que são utilizados na produção de alimentos para os ruminantes e produção de óleos essenciais (DE LA CRUZ, 2008).

O OE de *Citrus aurantium*, também despertou interesse da comunidade científica devido as suas propriedades antimicrobianas. Segundo o Mehl et al. (2014), este óleo possui mais de 200 componentes ativos divididos em hidrocarbonetos terpênicos e terpenos oxigenados (terpenóides), em proporções variáveis, sendo o constituinte principal o hidrocarboneto terpênico limoneno com um teor variando de 30% a 90% dependendo da espécie e da variedade da espécie. O limoneno tem sido bastante utilizado como aditivo alimentar em bebidas e pastilhas por possuir propriedades flavorizantes, sendo inclusive usado em fragrâncias e em produtos de limpeza, considerado seguro para seu uso como inseticida natural e repelente (SIMAS et al. 2015), anestésico, antimicrobiana, cicatrizante, antioxidante, anti-séptico, antitumorais, antidepressivas e imonuestimulante (LOPES et al. 2018).

Diante do exposto, torna-se vantajoso produzir uma ração contendo nanoemulsão à base de OEs enriquecida com vitaminas C, D, E cálcio e fósforo como aditivo alimentar para peixes como tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Produzir uma ração contendo nanoemulsão a base de óleos essenciais enriquecidos com vitaminas C, D e E, Cálcio e Fósforo como aditivo alimentar para peixes como tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

3.2 Específicos

- Produzir nanoemulsão água/óleo (A/O) enriquecido com vitaminas C, D e E, e fósforo.
- Caracterizar a nanoemulsão segundo a estabilidade e tamanho das partículas, características organolépticas e físico-químicas, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta.
- Avaliar o comportamento dos peixes que receberam a ração com nanoemulsão.
- Analisar os parâmetros zootécnicos dos animais submetidos ao tratamento com ração e nanoemulsão.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, G. O. et al. Revisão. Liberação Prolongada de Fármacos e suas aplicações Farmacológicas, **Rev. e-ciência**, v. 6, n. 1, p. 5-10, 2018.

ALKALADI, A. Vitamins E and C ameliorate the oxidative stresses induced by zinc oxide nanoparticles on liver and gills of *Oreochromis niloticus*, **Saudi J. Biolog. Sci.** v. 26, p. 357-362, 2019.

ANDRADE, C. L. et al. Nutrição e alimentação de Tilápias do Nilo, **Rev. Eletr. Nutritime**, v. 12, n. 6, 2015.

BARROS, M. M. et al. Níveis de Vitamina C e Ferro para Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), **Rev. Bras. Zootec.**, v. 31, n. 6, p. 2149-2156, 2002.

BASTO, S. R. L. et al. Revisão. Emulsão e microemulsão: novos sistemas de liberação controlada de fármacos no tratamento veterinário, **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 10, n. 1-4, p. 25-33, 2016.

BIZERRA, A.; SILVA, V., Sistemas de Liberação Controlada: Mecanismos e Aplicações, **Rev. Saúde e Meio Ambiente-RESMA**, v. 3, n. 2, p. 1-12, Brasil, 2016.

BOMFIM, M. A. D., Estratégias Nutricionais para Redução das Excreções de Nitrogênio e Fósforo nos Sistemas de Produção de Peixes no Nordeste: Sustentabilidade Ambiental e Aumento da Produtividade, **Rev. Científica Produção Animal**, v. 15, n. 2, p. 122-140, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de ciência, tecnologia e insumos estratégicos. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**, 2006.

BUITRAGO, C. G., Activation of RAF-1 through Ras and Protein Kinase C α Mediates $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D3 Regulation of the Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Muscle Cells, **J. Biol. Chemistry**, v. 278, n. 4, p. 2199–2205, 2003.

CHITMANAT, C. 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. 1, 2005.

COSTA, J. F. O. et al. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species, **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 20, n. 4, p. 502-505, 2010.

DAIRIKI, J. K. et al. Procedimento para inclusão de óleos essenciais em rações para peixes, **Circular Técnica**, 42, 1ª ed., 2013.

DALTIN, D., Tensoativos. Química, propriedades e aplicações, **Blucher**, 2011.

DE LA CRUZ, M. G. Plantas Mediciniais de Mato Grosso: A farmacopéia popular dos raizeiros, Cuiabá: **Carlini & Caniato Editorial**, 2008.

FARIA, R. H. S. et al. Manual de criação de peixes em viveiros, **Codevasf**, 2014.

FERNANDES, R. T. V. et al. Aditivos fitogênicos na alimentação de frangos de corte: óleos essenciais e especiarias, **PubVet**, v. 9, n. 12, p. 526-535, 2015.

FERREIRA J. D. et al. Plantas medicinais: uso e cultivo domiciliar no município de Bauru-SP. **Anuário da Produção de Inic. Científica**, v. 14, n. 25, p. 87-96, 2011.

FLORES, F. C. et al. Antifungal Activity of Nanocapsule Suspensions Containing Tea Tree Oil on the Growth of *Trichophyton rubrum*, **Mycopathologia**, 175: 281–286, 2013.

FRANCO, M. L. R. S. et al. Comparative analysis of the skins of nile tilapia, pacu and tambaqui: Histology, composition and resistance, **Arch Zootec**, v. 62, n. 237, p. 21-32, 2013.

FRANGE, R.C.C; GARCIA, M.T.J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física, **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, 30 (3): 263-271, 2009.

FURUYA, W. M. Nutrição de Tilápias no Brasil. Zootecnia e Engenharia de pesca, **Rev. Varia Sci. Agrárias**; v. 3, n. 1, p. 133-150, Brasil, 2013.

HELUY, G. M. Óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) como aditivo em dieta para alevinos de tilápia *Oreochromis niloticus* criadas em água salinizada, **Dissertação**, 2019.

HILL, E. K.; LI, J., Current and future prospects for nanotechnology in animal production, **J. Anim. Sci. Biotechnol.**, 8, 1-13, 2017.

HORTA, H. I. V. Aplicação de Nanossistemas na Terapêutica do Cancro do Pulmão; **Dissertação**, 2015.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal, 43: 1-49, RJ, 2015.

IZQUIERDO, M. S. et al. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish, **Aquaculture**, v. 197, p. 25–42, 2001.

JAISWAL, M. et al. Review article. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system, **3 Biotech.**, 5: 123-127, 2015.

JAMPILEK, J. et al. Potential of Nanomaterial Applications in Dietary Supplements and Foods for Special Medical Purposes, **Nanomaterials**, 9, 296, 2019.

JANCZYK, P.; PIEPER, R.; URUBSCHUROV, V.; WENDLER, K. R.; SOUFFRANT, W. B., Investigations on the effects of dietary essential oils and different husbandry conditions on the gut ecology in piglets after weaning, **Intern. J. Microbiol.**, 9p, 2009.

KUBITZA, F. **Panorama da aquicultura**, v. 21, n. 124, 2011.

LIMA, A. F.; BARBOSA, J. M., Crescimento, sobrevivência e resistência de larvas de tilápia em função da densidade e da suplementação com vitamina C, **Arch. Zootec.**, 65 (250): 117-121, 2016.

LIU, Y. et al. Effects of graded levels of dietary vitamin C on the growth, digestive capacity and intestinal microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio var. Jian*), **Aquaculture Research**, v. 42, p. 534-548, 2011.

LOPES, J. M. et al. Essential oils from *Citrus x aurantium* and *Citrus x latifolia* (Rutaceae) have anesthetic activity and are effective in reducing ion loss in silver catfish (*Rhamdia quelen*); **Neotropical Ichthyology**, 16 (2): e170152, 2018.

MARZUKI, N. H. C. et al. An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications, **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.33, n.1, p.779–797, 2019.

MEHL, F. et al. Differentiation of lemon essential oil based on volatile and non-volatile fractions with various analytical techniques: **A Metabolomic approach**, v. 143, n. 5, p. 325-335, 2014.

MENDES, F. A. Efeito da vitamina D no ganho de peso e nos níveis de cálcio e fósforo inorgânico de *Colossoma macropomum* (Characiformes, Serrasaimidae), **Dissertação**, 2000.

MIRANDA, E. C. et al. Relação Cálcio/Fósforo Disponível em Rações para Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), **Rev. Bras. Zootec.** 29 (6): 2162-2171, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient requirements of fish and shrimp, Washington, **National Academy Press**, 376 p, 2011.

NAVARRO, R. D. et al. importância das vitaminas E, C e A na reprodução de peixes: revisão de literatura, **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 33, BH, n. 1, p. 20-25, 2009.

NSONGA, A. R. et al. Effect Of Varying Levels Of Dietary Vitamin C (Ascorbic Acid) On Growth, Survival and Hematology Of Juvenile Tilapia, *Oreochromis Karongae* (Trewavas 1941) Reared In Aquaria, **Braz. J. Aquat. Sci. Technol.** 13(2): 17-23, 2009.

OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L. C.; MOURA, C. S. F. T. Frutas cítricas, **Rev. Faculd. Montes Belos**, v. 5, n. 4, 2012.

OMONJO, F. A. et al. Review. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production, **Anim. Nutrition**, v. 4 p. 126-136, 2018.

PADALIA, R. C.; VERMA, R. S.; CHAUHAN, A.; GOSWAMI, P.; VERMA, S. K.; DAROKAR, M. P. Chemical composition of *Melaleuca linarrifolia* Sm. from India: a potential source of 1,8-cineole, **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 63, p. 264-268, 2015.

PAREDES, A. J.; ASENCIO, C. M.; MANUEL, L. J.; ALLEMANDI, D. A.; PALMA, S. D., Nanoencapsulation in the food industry: manufacture, applications and characterization, **J. Food Bioengineering and Nanoprocessing**, v. 1, p. 56-79, 2016.

PEIXE BR. Anuário Brasileiro da Piscicultura, 2019.

PEIXE BR. Anuário Brasileiro da Piscicultura, 2020.

PEZZATO, L. E. et al. Exigência em fósforo disponível para alevinos de tilápia do Nilo, **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p.1600-1605, 2006.

RIBEIRO, F. B. et al. Níveis de fósforo total em dietas para alevinos de tilápia-do-Nilo. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 35, n. 4, p. 1588-1593, 2006.

ROCHA, M. K. H. R. Cálcio e Fósforo para juvenis da Tilápia-do-Nilo, **Tese**, 2016.

ROTTA, M. A. Utilização do ácido ascórbico (vitamina C) pelos peixes, **Embrapa Pantanal**, 54 p, 2003.

SAGAVE, L. et al. Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.67, n.1, p.221-226, 2015.

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

SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, J. E. R., Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia, 2017.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Aquicultura no Brasil**, 2015.

SILVA, G. F. Nutrição e alimentação. In: SILVA, G. F. et al. TILÁPIA-DO-NILO. Criação e cultivo em viveiros no estado do Paraná, **Aquac. Meio ambiente. Desenvolvimento**, 290p, 2015.

SILVA, P. T. et al. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology, **Rural Science**, v. 44, n. 7, p. 1304-1311, 2014.

SIMAS, D. L. R. et al. Caracterização dos óleos essenciais de frutas cítricas, **Citrus Research and Technology**, v. 36, n. 1, p. 15-26, 2015.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts development and applications in drug delivery, **J. Controlled Release**, v. 252, p. 28-49, 2017.

STELLA, L. A. et al. Óleos essenciais como alternativa para a redução do metano em ruminantes, **Nutritime Revista Eletrônica, on-line**, v. 14, n. 4, p. 6091-7000, 2017.

SUTILI, F. J. Óleos Essenciais de plantas como alternativas aos fármacos convencionais na produção de peixes, **Tese**, 2016.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions, **Advances in Colloid and Interface Science**, 108, 303-318, 2004.

TEDESCO, L. et al. Avaliação antibacteriana do extrato de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) frente à Cepa de *Staphylococcus aureus*, **Arq. Cienc. Saúde UNIPAR**, v. 18, n. 2, p. 89-94, 2014.

THANGARAJ, S.; SEETHALAKSHMI, M., Microencapsulation of Vitamin C through Extrusion Process, **Int. J. Adv. Res. Biol.Sci.** 1 (7), p. 16-21, 2014.

TOYAMA, G. N. et al. Suplementação de vitamina C em rações para reversão sexual da tilápias-do-nilo, **Scie. Agricola**, v. 57, n. 2, p. 221-228, 2000.

VALLADÃO, G. M. R., Óleos essenciais de plantas na dieta de tilápia-do-Nilo: efeitos sobre a saúde, morfologia intestinal e microbiota, **Tese**, v. 136, 2018.

VIDAL, M. F., Panorama de piscicultura no nordeste, **Caderno Setorial ETENE**, n. 1, 2016.

VIEIRA, T. R. et al. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae), **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 536-539, 2004.

WEEGE, V. et al. Uso de óleos funcionais em leitões em creche. Zootecnia; Nutrição e Alimentação Animal, **XXVIII Encontro Anual de Iniciação Científica, V Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior**, 2019.

WINDISCH, W. et al. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry, **J. Anim. Sci.**, v. 86, E140-E148, 2008.

YAP, P. S. C. et al. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance, **The Open Microbiology Journal**, v. 8, p. 6-14, 2014.

ZENG, Z. et al. a review. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition:, **J. Anim. Sci. Biotechnol.**, v. 6, n. 7, 2015.



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

Número do Processo: BR 10 2020 004277 7

“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ENRIQUECIDOS COM VITAMINAS E SAIS MINERAIS ADICIONADA À RAÇÃO PARA PEIXES”

Campo da invenção

[001] O presente pedido de patente de invenção descreve o processo de produção de nanoemulsão a base de óleos essenciais enriquecidos com vitaminas e sais minerais, adicionada à ração para peixes como tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). A nanoemulsão produzida pelo processo de emulsificação sob agitação constante utilizando diferentes tipos de óleos essenciais, é utilizada como uma alternativa eficiente para a encapsulação de nutrientes, com vista a melhorar a dieta e otimizar o índice de crescimento em peixes como tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). A invenção está situada no campo da aquicultura com destaque em bionanotecnologia aplicada a ciência animal.

Fundamentos da invenção

[002] Na piscicultura, a nutrição e a alimentação são fatores que estão diretamente relacionados com a produtividade do empreendimento em sistemas de criação, promovendo a saúde dos animais, interferindo no seu desempenho e na qualidade nutricional de sua carne, produto final que será destinado ao mercado consumidor. Não obstante, o cultivo intensivo de peixes envolve riscos financeiros e ambientais devido ao inadequado manejo nutricional e sanitário que pode impactar negativamente na produção e gerar grandes quantidades de resíduos afectando

diretamente a qualidade da água (CYRINO et al., *Rev. Bras. Zootec.*, v.39, p.68-87, 2010; LUNDSTEDT et al., *EMBRAPA*, 1:145-162, 2016).

[003] Na produção extensiva de peixes, comumente tem se utilizado resíduos alimentares sem adição de algum suplemento nutritivo tendo como resultando, lento desenvolvimento dos animais afetando diretamente sua reprodução e imunidade, pois peixes com deficiência nutricional tornam-se vulneráveis à doenças e são intolerantes ao manuseio e transporte vivo (LOVELL, *J. of Anim. Sci.*, v.69, p.4193-4200, Champaign, 1991; NRC-Nacional Research Council. *National Academy Press*, 114p, Washington, 1993). Além disso, devido a intensificação do cultivo e introdução de espécies exóticas sem o devido cuidado sanitário, criam um ambiente favorável para a introdução e desenvolvimento de patógenos causando várias doenças no plantel. Um dos propósitos mais importantes na produção de peixes é melhorar o crescimento e controlar as doenças oportunistas, neste caso, antibióticos e outros agentes terapêuticos são comumente utilizados para este fim (US 5,192,748 A (1993); US 4,218,451 A (1980); RANDRIANARIVELO et al., *J. Appl. Microbiol.*, 109, 642-650, 2010; AUSTIN; AUSTIN, *Springer-Praxis*, 4^aed., Godalming, 2007; ALLEN et al., *Trends Microbiol.*, 21:114-119, 2013; WU et al., *Fish Shellfish Immunol.*, 1-8, 2013). Porém, o uso de antibióticos leva à resistência bacteriana e à presença de resíduos na carne de peixe (ESIOBU et al., *Int. J. Environ. Health Res.* 12 (2): 133-144, 2002). Aliado a isso, o uso indiscriminado de produtos químicos pelos produtores causam impactos ambientais, porque a água que é retirada de sua fonte é devolvida depois de passar pelos tanques, e esses produtos podem ser transportados causando riscos a saúde humana e a de muitos organismos aquáticos (MAXIMIANO et al., *Ciência e saúde coletiva*, 10 (2): 483-491, 2005).

[004] A nutrição tem papel fundamental na vida dos peixes, pois os torna mais fortes e resistentes à doenças oportunistas e à variações do ambiente em que estão inseridos, além de, estimular o crescimento aumentando o número de safras anuais. Também melhora a taxa de conversão alimentar, aumenta o desempenho reprodutivo dos machos e das matrizes aumentando deste modo, a qualidade das larvas e alevinos (LOPES, *Piscicultura*, 80p, Brasil, 2012). Em piscicultura intensiva,

normalmente os peixes se alimentam somente de ração, sendo necessário que esta seja palatável e de boa qualidade para que atenda as exigências nutricionais dos animais a fim de obter um desempenho zootécnico satisfatório e rápido retorno do capital investido (FURUYA et al., *Nutriaqua, Soc. Bras. de Aquic. e Biol. Aquática*, 1ª ed, p.74-75, Florianópolis, 2013). Com isso, pesquisas relacionadas com alimentação e nutrição de peixes têm sido realizadas e direcionadas à produção de ração de alto valor nutricional e maior digestibilidade que aumente a qualidade do produto, minimize os custos de produção, maximize a produtividade e diminua a quantidade de resíduos para o meio ambiente (CYRINO et al., *Rev. Bras. Zootec.* v.39, p.68-87, 2010; PORTZ; FURUYA, *Nutriaqua, Soc. Bras. de Aquic. e Biol. Aquática*, p.65-77, Florianópolis, 2012).

[005] Os aminoácidos essenciais, ácidos graxos essenciais, sais minerais e vitaminas são nutrientes importantes e fundamentais requeridos pelos peixes na sua alimentação para o normal funcionamento de processos biológicos. Os minerais e as vitaminas são nutrientes comumente utilizados na produção de ração, importantes para a formação do tecido ósseo, sanguíneo e escamas dos peixes, síntese de metaloproteínas (hemoglobina), síntese de células de defesa, atuam como cofatores enzimáticos em processos metabólicos, na integridade da pele, brânquias e mucosa intestinal e também desempenham funções específicas no equilíbrio ácido-base do sangue, no processo de cicatrização e na transmissão dos impulsos nervosos (KUBITZA, *Panorama da aquic.*,v.9, n. 52, 1999).

[006] Os minerais são compostos inorgânicos essenciais utilizados pelos peixes, e diferem de outros nutrientes por não serem produzidos pelo organismo animal, precisando ser adicionados na dieta. Estes compostos desempenham várias funções biológicas como, estruturais (constituição de tecidos ósseos e proteínas musculares), regulatórias (regulam as reações enzimáticas do organismo) e fisiológicas (mantêm o balanço osmótico entre os fluidos corporais e a água e a permeabilidade da membrana) (LOPES, *Piscicultura*, 80p, Brasil, 2012).

[007] O fósforo é um dos elementos inorgânicos fundamentais para a vida dos peixes, essencial para o crescimento, mineralização óssea, metabolismo energético

e reprodução (MIRANDA et al., *Rev. Bras. Zootec.*, 29 (6): 2162-2171, 2000; PEZZATO et al., *AQUANUTRI*, Palestra I Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes, Botucatu, 2005; PEZZATO et al., *Ciência Rural*, v.36, n.5, p.1600-1605, 2006; FRACALLOSSI; CYRINO, *Soc. Bras. de Aquic. e Biol. Aquática*, 375p Florianópolis, 2013), estando presente em ácidos nucléicos, fosfolípidos, enzimas, compostos glicolíticos e de alta energia, participando de inúmeros processos metabólicos essenciais e atua na fosforilação oxidativa (BERNE, *Fisiologia*, 2ª edição, 829p, RJ, 1980). Sinais de sua deficiência no peixe, incluem a falta de apetite, dificuldades na digestibilidade de lipídeos, carboidratos, redução na eficiência alimentar, maior acúmulo de gordura na carcaça, deformação dos ossos da região da cabeça, menor mineralização óssea e conseqüentemente, crescimento reduzido (NRC-National Research Council - *Nutrient Requirements of Fish*, National Academy Press, 124p, Washington, 1993; FURUYA et al., *Aquac. Research*, v.3, p.1110-1116, 2004a). Em ambiente natural (sistema extensivo), a disponibilidade deste nutriente na água, não é suficiente para atender a demanda nutricional (MIRANDA et al., *Rev. Bras. de Zoot.*, v.29, p.2162-2171, 2000; FURUYA et al., *Rev. Bras. de Zoot.*, v.37, p.961-966, 2008a; NRC-National Research Council - *Nutrient Requirements of Fish*, National Academy Press, 376p, Washington, 2011), e em dietas formuladas à base de ingredientes de origem vegetal, o fósforo é o nutriente mais limitante, por estar presente na forma de fitato, pouco disponível aos peixes (VIELMA; LALL, *Aquac.*, v.160, p.117-128, SP, 1998). A dieta desempenha maior importância do que a água para satisfazer a necessidade dos peixes em fósforo, e quase 90% do nutriente proveniente desta dieta é destinado a constituição dos tecidos de sustentação. O restante do fósforo não absorvido pelo animal é excretado e perdido na água, podendo causar a eutrofização do meio após a decomposição, levando como consequência à características organolépticas indesejáveis da carne do peixe. Este impacto ambiental está relacionado com a quantidade e qualidade do fósforo presente na ração (ROY et al., *Fish Physiol. Biochem.*, v.27, p.35-48, 2002; TANG et al., *The Sci. World Journal*, 2012), e a forma como é administrado aos animais também contribui para perda deste nutriente na água.

[008] As vitaminas são moléculas orgânicas essenciais na dieta dos peixes e estão envolvidas em 100% nas reações químicas destes animais, atuando como cofatores ou substratos com funções específicas no processo metabólico celular. Estão divididas em hidrossolúveis (solúveis em água) e lipossolúveis (solúveis em gorduras/óleos) (LOPES, *Piscicultura*, 80p, Brasil, 2012), sendo estas sensíveis à oxidação (US 6,531,157 B1 (2003); ES 2192243 T3). A deficiência ou ausência de uma determinada vitamina ocasiona uma hipovitaminose, perda de apetite, descoloração da pele, perda de coordenação, estresse, hemorragias, lesões, fígado com grânulos de gordura, aumento de susceptibilidade às infecções bacterianas, crescimento reduzido e aumento na taxa de mortalidade.

[009] A vitamina C é uma das vitaminas mais estudadas para peixes, visto que, tanto estes quanto outros animais não são capazes de sintetizá-la, sendo necessária a sua inclusão na dieta diária. Ela é fundamental na nutrição de peixes especialmente nos estágios iniciais de vida, por apresentar um efeito direto no seu crescimento e desenvolvimento dos processos digestivos e por desempenhar um papel importante na formação do colágeno que é o componente do esqueleto (NSONGA et al., *Braz. J. Aquat. Sci. Technol.*, 13 (2):17-23, 2009; OLIVEIRA et al., *Rev. Eletrônica Nutritime*, 146, v.8, n.5, p.1612-1618, 2011). Sua suplementação permite obter melhores índices de sobrevivência de larvas quando submetidas ao tratamento hormonal para reversão sexual (WO 2009/112682 A1; TOYAMA et al., *Sci. Agrícola*, v.57, n.2, p.221-228, 2000; CAVICHIOLO et al., *Acta Scientiarum*, v.24, n.4, p.943-948, 2002), otimização do desempenho animal, podendo atuar na manutenção do tecido conectivo normal, na cicatrização, na síntese proteica (KANEKO et al., *Academic Press*, cap.24, ed.5, 907p, San Diego 1997) e síntese de glóbulos na corrente sanguínea importantes no transporte de oxigênio e dióxido de carbono, ajuda na absorção do ferro evitando anemia em peixes (BARROS et al., *Rev. Bras. Zootec.*, v.31, n.6, p.2149-2156, 2002; WO 2009/112682 A1), e juntamente com a vitamina E, minimiza a peroxidação de lipídeos nos tecidos do organismo. A deficiência desta vitamina, causa deformações e doenças estruturais, como a escoliose, lordose e cifose, deformidades no opérculo e nas cartilagens das brânquias, anemia, hemorragia em vários órgãos, enfraquecimento do sistema

imunológico, redução na eclosão e no desempenho, crescimento reduzido, perda de apetite e baixa conversão alimentar. Durante os manejos de rotina na piscicultura, os peixes são frequentemente expostos ao ar para a realização de biometrias e classificações, o que causa estresse oxidativo sendo prejudicial à saúde por causar danos em lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos que pode levar à redução do consumo de ração, do crescimento e aumento de susceptibilidade à doenças. Portanto, a vitamina C aumenta a capacidade antioxidante das células neutralizando os radicais livres (LOVELL, *Van Nostrand Reinhold*, 260p, 1989; FALCON et al., *J. of the World Aquac. Society*, v.38, p.287-295, 2007; WO 2009/112682 A1).

[0010] Outra importante vitamina, a vitamina D é lipossolúvel e essencial para o funcionamento normal do organismo, importante no metabolismo de cálcio e fósforo, podendo atuar na regulação da absorção de cálcio induzindo o transporte do mineral para o lúmen intestinal por meio de canais de cálcio. Está dividido em dois tipos sendo D3 (colecalfiferol) e D2 (ergocalciferol). É convertida em 25-hidroxivitamina D3 (ou calcidiol), uma molécula lipossolúvel produzida principalmente por uma ou mais enzimas localizadas no fígado, podendo também ser produzida fora do fígado em certas células como enterócitos, que contêm enzimas semelhantes às encontradas no fígado (US 2019/0060329 A1). A vitamina D participa da mineralização óssea (BUIRAGO et al., *J. Biol. Chem.* 278 (4), 2199-2205, 2003), formação de osteoblastos (células osteoprogenitoras responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea) (BUIRAGO et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 (5), 1150-1156, 2001), no desenvolvimento fetal e na função normal do sistema nervoso, pâncreas e sistema imunológico. Também possui efeitos anti-inflamatórios, tromborregulatório e antioxidante. Sugai; Matsuda, (*J. Biochem. Biophys.*, 170, 474-475, 1968); Buitrago et al. (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 (5), 1150-1156, 2001); Buitrago et al. (*J. Biol. Chem.*, 278 (4), 2199-2205, 2003), demonstraram que a vitamina D estimula a proliferação e crescimento de células musculares. A importância desta vitamina na redução da taxa de mortalidade foi descrita por Elwakeel et al. (*Anim. Feed Sci. and Technol.*, v.254, 2019). Outra importante vitamina, a vitamina D é lipossolúvel e essencial para o funcionamento normal do organismo, importante no metabolismo de cálcio e fósforo, podendo atuar

na regulação da absorção de cálcio induzindo o transporte do mineral para o lúmen intestinal por meio de canais de cálcio. Está dividido em dois tipos sendo D3 (colecalciferol) e D2 (ergocalciferol). É convertida em 25-hidroxivitamina D3 (ou calcidiol), uma molécula lipossolúvel produzida principalmente por uma ou mais enzimas localizadas no fígado, podendo também ser produzida fora do fígado em certas células como enterócitos, que contêm enzimas semelhantes às encontradas no fígado (US 2019/0060329 A1). A vitamina D participa da mineralização óssea (BUITRAGO et al., *J. Biol. Chem.* 278 (4), 2199-2205, 2003), formação de osteoblastos (células osteoprogenitoras responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea) (BUITRAGO et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 (5), 1150-1156, 2001), no desenvolvimento fetal e na função normal do sistema nervoso, pâncreas e sistema imunológico. Também possui efeitos anti-inflamatórios, tromborregulatório e antioxidante. Sugai; Matsuda, (*J. Biochem. Biophys.*, 170, 474-475, 1968); Buitrago et al. (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 (5), 1150-1156, 2001); Buitrago et al. (*J. Biol. Chem.*, 278 (4), 2199-2205, 2003), demonstraram que a vitamina D estimula a proliferação e crescimento de células musculares. A importância desta vitamina na redução da taxa de mortalidade foi descrita por Elwakeel et al. (*Anim. Feed Sci. and Technol.*, v.254, 2019).

[0011] A vitamina E (α - Tocoferol) é uma substância oleosa, líquido lipofílico miscível em qualquer fase hidrofóbica ou lipídica, é instável e facilmente oxidável e perde maior parte de sua atividade biológica quando está no estado oxidado (US 2006/0246117 A1; WO 2005/039307 A1; PI 0415701-0 A). É uma vitamina muito importante pois apresenta maior atividade biológica quando comparada aos outros compostos, devido a maior índice de absorção intestinal, maior deposição nos tecidos, menor excreção fecal e oxidação mais lenta (US 2006/0246117 A1; WO 2005/039307 A1). Atua como um importante antioxidante metabólico (ALKALADI, *Saudi J. of Biol.Sci.*, 26, 357-362, 2019), estando presente nas membranas celulares dando proteção contra oxidação de ácidos graxos poli-insaturados e do colesterol interferindo na sua estabilidade e também reduz ou inibe a produção e ação dos radicais livres, estimula o sistema imunológico aumentando as defesas e protege a carne do peixe durante o armazenamento (OTANI, Dissertação, Pós-graduação em

Aquicultura, SP, 2009; NAVARRO et al., *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 33: 20-25, 2009). Os efeitos da vitamina E no desenvolvimento gonadal, na fecundidade, qualidade dos ovos e na sobrevivência das larvas, foram demonstrados por Izquierdo et al. (*Aquac.*, 197: 25-42, 2001); Cavichiolo et al. (*Acta Scientiarum*, v.24, n.4, p.943-948, Maringá 2002) e Navarro et al. (*Arch. Zootec.*, 59 (228): 519-528, 2010).

[0012] Alguns desses nutrientes, como por exemplo, a vitamina C e o fósforo por serem hidrossolúveis, sua estabilidade fica comprometida propiciando grandes perdas pelo processo de lixiviação, fazendo com que os animais não consigam satisfazer as suas necessidades nutricionais. E para reduzir os problemas de perdas desses nutrientes por lixiviação, muitos piscicultores optam pela suplementação excessiva na dieta (TOYAMA et al., *Sci. Agrícola*, v.57, n.2, p.221-228, 2000). Esta forma de suplementação de nutrientes em doses elevadas não é ideal pois, o nível de exigência de cada nutriente é influenciado por fatores como a espécie animal, idade ou fase de desenvolvimento, tamanho, estado fisiológico e reprodutivo, temperatura da água, sistemas e regimes de produção (FURUYA, Congresso Brasileiro de Zootecnia, Brasil, 2010; PEZZATO et al., *TecArt*, p.75-169, São Paulo, 2004; FRACALOSSO et al., *Nutriaqua, Soc. Bras. de Aquic. e Biol. Aquática*, 1ª ed., p.37-63, Florianópolis, 2012). Adicionalmente, pode tornar-se oneroso aumentado assim o custo total de produção, aliado a isso, o excesso de nutrientes no ambiente aquático pode causar a eutrofização da água, alterando deste modo o sabor da carne do peixe (FURUYA, *III Seminário de aquicultura, maricultura e pesca, Anais*, p. 121-139, Belo Horizonte, 2007; DIEMER, *Tese*, Unioeste, Marechal Cândido Rondon, 2011).

[0013] Todavia, perante os problemas de perdas de alguns nutrientes na água devido a sua solubilidade, dificultando o máximo aproveitamento pelos animais, viu-se necessária a utilização de formas mais estáveis e protegidas, e menos sujeitas a perdas por oxidação ou lixiviação (SOLIMAN et al., *Aquac.*, v.52, p.1-10, 1986; SHIAU; JAN, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, v.58, p.671-675, 1992 SHIAU; HSU, *Aquac.*, v.133, p.147-157, 1995; NITZAN et al., *The Israeli J. of Aquac.*, v.48, p.133-141, 1996; BOMFIM, *Rev. Cient. Prod. Anim.*, v.15, n.2, p.122-140, 2013). Uma das formas de proteção física é a encapsulação. Alguns

exemplos podem ser citados como glicerídeo, etilcelulose e polímero sintético, onde este último mostrou ser o mais eficiente em relação aos outros (SKELBAEK et al., *Aquac.*, v.84, n.3-4, p.335-343, 1990). O documento US 5,229,147 A (1993) descreve um exemplo de encapsulação em que a vitamina C é revestida por partículas lipídicas como forma de proteger contra ação dos fatores abióticos que possam reduzir sua atividade fisiológica. As gorduras com altos pontos de fusão e altamente digestíveis também têm sido utilizadas na proteção de nutrientes adicionados às rações na piscicultura sem afetar a sua biodisponibilidade, e por serem lipossolúveis evitam a sua lixiviação. Porém, existe uma limitação, quando ocorre forte atrito ou calor essa proteção pode se romper e afetar o nutriente (O'KEEFE, *American Soybean Association-ASA, Technical Bulletin*, Vol. AQ48, 8p, Singapore, 2001). Entretanto, métodos químicos de estabilização de nutrientes foram desenvolvidos com vista a manter a sua atividade biológica nas rações utilizadas em piscicultura. Um método importante e capaz de estabilizar os componentes funcionais sem perder nutrientes na água, e aumentar a eficiência de absorção é a utilização da nanotecnologia (WO 2009/020280 A1), uma ferramenta multidisciplinar que envolve a criação e utilização de diferentes sistemas em escala nanométrica (INSTITUTO INOVAÇÃO, *Nanotecnologia*, 2005).

[0014] Com o avanço científico da nanotecnologia, é possível desenvolver sistemas de liberação controlada (SLCs) nanoestruturados para o encapsulamento de substâncias com atividade biológica (ABBASI et al., *J. Ultrasonics-Sonochemistry*, 50, 208-217, 2019). Os SLCs são constituídos por sistemas muito pequenos de tamanho nano (20-500 nm) (SCHAFFAZICK et al., *Química nova*, v.26, p.726-737, 2003; FERNANDEZ et al., *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 251:53-58, 2004), com capacidade de armazenar uma substância, conduzi-la até o local específico e liberá-la de forma controlada, aumentando deste modo, a eficiência do produto. Esses sistemas oferecem proteção à substância encapsulada, aumentando a sua estabilidade e biodisponibilidade (HILL; LI, *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 8, 1-13, 2017). Também reduz os efeitos colaterais visto que utiliza menores quantidades de princípio ativo (ASSIS et al., *Braz. J. of Food Technol.*, 15 (2), 99-109, 2012;

BIZERRA; SILVA, *Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA*, v, 3, n.2, p. 1-12, 2016).

[0015] Nanoemulsões são utilizados como SLCs por serem eficientes no encapsulamento de nutrientes, e por possuírem grande capacidade de retenção podem se manter por um tempo prolongado no organismo (SINGH et al., *J. Control Release*, v. 252, p.28-49, 2017). Nanoemulsões simples são sistemas heterogêneos e instáveis formadas por uma dispersão fina de dois líquidos imiscíveis óleo e água (O/A) compondo duas fases, a orgânica e a aquosa respectivamente onde um líquido está disperso no outro em forma de vesículas ou gotas (WO 2009/020280 A1; DALTIM, *Blucher Química*, SP, 2011; DALTIM, *Blucher Química*, SP, 2012; LAKSHMI et al., *Int. J. Pharm. Sci. R. Res.*, 20, 51-59, 2013). Com a utilização de agentes tensoativos essas nanoemulsões formam uma única mistura homogênea óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), sendo as mais comuns O/A (SILVA et al., *Food Bioproc. Technol.*, v.5, n.3, p.854-867, 2012; O'HANLON et al., *J. Fluorine Chem.*, 137, 27-33, 2012). Diferem das emulsões ou microemulsões pelo fato de as nanoemulsões serem termodinamicamente estáveis, ou seja, estáveis por um longo período de tempo e possuir uma distribuição óptica com tamanho de partículas inferior a 400 nm (SCHAFFAZICK et al., *Química nova*, v.26, p.726-737, 2003; SCHAFFAZICK et al., *Acta Farm. Bonaerense*, 21 (2): 99-106, 2002), ao passo que as emulsões são opacas e termodinamicamente instáveis (WO 2009/020280 A1).

[0016] De modo a otimizar a dieta e a saúde dos peixes, óleos essenciais (OEs) de plantas normalmente extraídas pela hidrodestilação, podem ser utilizados para a produção de nanoemulsões (WO 2008/155536 A1; LI et al., *Livest. Sci.*, 145, 119-123, 2012) devido às suas propriedades benéficas no desempenho produtivo e na sobrevivência dos animais (ZENG et al., *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 6 (1), 7, 2015; PUVACA et al., *World's Poult. Sci. J.* 69, 27-34, 2013; OMONIJO et al., *Anim. Nutrition* 2017). Os OEs de plantas apresentam várias propriedades tais como imunoestimulantes (ZENG et al., *J. of Anim. Sci. Biotechnol.*, 6 (1), 7, 2015), antioxidantes, antimicrobiano, antifúngico e antiviral (BRENES; ROURA, *Anim. Feed Sci. Technol.* 158, 1-14, 2010). Alguns são usados como medicamentos complementares ou alternativos para estimular a saúde humana ou curar doenças

(KIM et al., *J. Anim. Sci.*, 86, p.138-139, 2008), outros são utilizados como conservantes naturais, aromatizantes e fragrâncias em produtos cosméticos (ORAFIDIYA; OLADIMEJI, *Int. J. Pharm.*, 237: 241-249, 2002), outros ainda, com o potencial inseticida ou repelentes de insetos (OYEDELE et al., *Insect Sci. Appl.* 20: 123-128, 2000; GHOSH; MUKHERJEE, *Asian J. Chem.*, 25, 321-323, 2013; DUARTE et al., *Braz. J. Pharmacog.*, 25, 189-192, 2015), ectoparasitas (OLADIMEJI et al., *J. Ethnopharmacol.*, 72: 305-311, 2000), anticolinesterase (CARVALHO, TCC-Trabalho de Conclusão de Curso, São João del-Rei, 2017), antidiarreico (ORAFIDIYA; OLADIMEJI, *Int. J. Pharm.* 237: 241-249, 2002), antimicrobiano e citotóxico (APEL et al., *Pharmacol.*, 3: 376-383, Brasil, 2006; STEFANELLO et al., *Chem. Biodivers.*, 8: 73-94, 2011).

[0017] Em piscicultura os OEs são importantes para o tratamento de doenças parasitárias, bacterianas e virais (VALLADÃO et al., *J. of Vet. Pharmacol. Ther.*, 38 (5), 417-428, 2015). Porém, apesar de ser pouco estudado, é também utilizado como um aditivo alimentar imunoestimulante e promotor de crescimento (BABA et al., *Aquac.*, 465, 13-18, 2016; SUTILI et al., *Rev. in Aquac.*, 2017), tanto para animais aquáticos quanto para não aquáticos. Os OEs possuem várias vantagens por serem substâncias, biodegradáveis e que não causam a resistência bacteriana (BAKKALI et al., *Food and Chem. Toxicol.*, 46 (2), 446-475, 2008; YAP et al., *The Open Microbiol. J.*, 8, p 6-14, 2014). Pode-se citar exemplos da utilização de OEs em aditivos alimentares como antibacterianos e imunoestimulantes para tilápias L. (BABA et al., *Aquac.*, 465, 13-18, 2016), frangos (MITSCH et al., *Poultry Sci.*, vol. 83, p 669-675, 2004), antiparasitários para aves (WO 96/13175) e também para o tratamento da enterite (WO 99/59430).

[0018] O óleo essencial de *Melaleuca aliterneifolia* (árvore de chá), planta nativa da Austrália pertencente à família *Myrtaceae* possui como principal componente ativo, o terpineol, responsável por uma ampla atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasitária e antioxidante (US 2002/0001601 A1; KIM et al., *J. Agricult. Food Chem.* 52 (10), 2849-2854, 2004; CARSON et al., *Clinical Microbiol. Rev.*, 19 (1), 50-62, 2006). Em piscicultura, o óleo essencial de melaleuca é eficaz no tratamento de doenças parasitárias quando adicionado na água (STEVEDING et al., *Diseases of*

Aquatic. Organisms, 66 (1), 29-32, 2005), porém seu efeito quando adicionado na ração de peixes é escasso (VALLADÃO, tese, Centro de Aquicultura da Unesp, 115p, Jaboticabal, 2018).

[0019] O óleo essencial de *Citrus aurantium*, nativa da Ásia, também desperta bastante atenção devido às suas propriedades antimicrobianas. Lima, (dissertação, Centro de Aquicultura da Unesp, 68p, 2015); Baba et al. (*Aquac.*, 465, 13-18, 2016) demonstraram que adição de OE de citrus na dieta de tilápia nilótica, promove uma melhora significativa nos parâmetros hematológicos, imunológicos e na atividade respiratória de leucócitos das tilápias, indicando que este OE pode ser utilizado como um antimicrobiano sendo uma alternativa eficiente em substituição aos antibióticos. Assim como a melaleuca, o citrus também apresenta terpenos, tendo o limoneno como o principal componente ativo. Estudos realizados por Aanyo et al. (*Aquac.*, 488, 217-226, 2018) demonstraram que o limoneno na dieta pode melhorar o crescimento de juvenis de tilápia nilótica através da ativação de genes-chaves envolvidos no crescimento mediado pelo eixo somatotrófico, digestão de nutrientes e defesa de enzimas antioxidantes. A utilização desses OEs em nanoemulsões para o encapsulamento de nutrientes, é vantajoso porque além de estimular a saúde e bem-estar devido as propriedades que possuem, também podem melhorar a palatabilidade da dieta havendo maior absorção de nutrientes devido ao sabor e odor aprimorados (KROISMAY et al., *J. Anim. Sci.* 84, 329, 2006).

[0020] Diante do exposto, torna-se necessária a produção de nanoemulsões a base de óleos essenciais de plantas enriquecido com vitaminas e sais minerais adicionada à ração para peixes como Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Essa estratégia é viável para melhorar a absorção de nutrientes, melhorar o nível nutricional e otimizar a saúde e o crescimento dos peixes.

[0021] Certas patentes apresentam processos de produção de emulsões com as mais variadas composições, diferindo da presente invenção, como descrito a seguir.

[0022] O documento WO 2014/066682 A1 descreve um processo de fabricação de um pó nutricional emulsionado utilizando um aparelho extrusor para misturar e emulsionar todos os componentes internamente, como forma de reduzir a perda de

nutrientes de uma vitamina lábil ao calor. Este documento difere da presente invenção pelo fato de não utilizar óleo essencial, não se apresentar como uma nanoemulsão, pois os componentes (Carboidratos, proteínas, minerais, vitaminas, aminoácidos, óleo, gordura e água) são introduzidos de uma única vez na máquina extrusora para formar uma única mistura emulsionada. Além disso não é adicionado surfactantes e nem conservantes.

[0023] O documento US 2006/0246117 A1, refere-se a administração por via oral de uma formulação de vitamina E misturado com um aditivo ou um alimento para animais monogástricos como porcos, aves, peixes e camarões. Foi adicionada à formulação, um emulsificante alimentar, o monooleato de sorbitano, para aumentar significativamente a biodisponibilidade dos derivados da vitamina E, que são capazes de serem hidrolisados no trato gastrointestinal na forma assimilável da vitamina E. Esta vitamina foi protegida até atingir o seu local de absorção, e é biodisponível em alto grau. O documento difere da presente invenção pelo fato de não ser uma nanoemulsão, não utilizar óleos essenciais em sua composição e nem conservantes.

[0024] O documento WO 2009/020280 A1 retrata sobre a produção de nanoemulsão utilizando vários tipos de óleos essenciais como de *Capsicum annum* L, *Zingiber officinale*, *Allium sativum* L e *Allium capa* adicionados a uma solução de quitosana e tween 80 como tensoativo capaz de estabilizar componentes funcionais dos alimentos e maximizar a reabsorção interna, reduzir o forte efeito intestinal e o sabor. A nanoemulsão é utilizada como um veículo transportador de componentes funcionais nos alimentos, até que estes atinjam o órgão específico desejado. O documento difere da presente invenção por não utilizar vitaminas e nem sais minerais na nanoemulsão e os óleos essenciais utilizados são diferentes desta invenção.

[0025] O documento US 2,851,357 A refere-se a produção de uma emulsão alimentar homogênea estável e fluída, contendo concentrados aquosos de peixe, gorduras neutras ou ácidos graxos e água destilada, para ser aplicada em alimentos para animais. Esse documento difere da presente invenção porque a emulsão não

utiliza óleo essencial, vitaminas, sais minerais, surfactantes, e nem conservante alimentar para incrementar a vida útil do produto.

[0026] O documento US 6,531,157 B1 descreve o processo de preparação de emulsões estáveis de pós secos de misturas de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) para a nutrição animal. O documento difere da presente invenção pois não utiliza óleo essencial, sais minerais e nem conservante alimentar

[0027] O documento US 4,818,521 A descreve uma emulsão cosmética tipo O/A contendo estavelmente a vitamina C, que compreende uma mistura de ácido L-ascórbico ou éster de ácido graxo e um óleo, e ingredientes convencionais, sendo adicionado um emulsificante ativo não iônico e metilparabeno como conservante do produto. Este documento difere da presente invenção porque não utiliza óleo essencial, vitaminas D e E, também a via de administração da emulsão é dérmica, portanto, não pode ser incluída em ração para peixe.

[0028] O documento FR 2546768 A1 descreve o processo de preparação de emulsões aquosas estáveis utilizando óleo essencial ou materiais lipossolúveis e saponinas como emulsificantes. Este documento também difere da presente invenção pois não utiliza nenhum tipo de conservante, vitaminas ou sais minerais.

[0029] O documento US 2,807,546 A refere-se a suplementos alimentares para animais ruminantes contendo melaço, sal vitamínico e fósforo, produzidos a base de emulsões estabilizadas com o tween 80 e servindo como transportador de vitaminas A, C e D, além de proteger estes nutrientes da oxidação para que não percam substancialmente sua eficácia, principalmente quando misturadas com alimentos secos, por isso sendo incorporadas à emulsão um antioxidante sinérgico. Este documento difere da presente invenção pelo fato de a emulsão não utilizar óleo essencial, vitamina E e nem conservante alimentar.

[0030] O documento US 3,413,118 descreve um alimento para gado contendo nitrogénio não proteico que consiste em sais de uréia e amônio, em que este nitrogénio não proteico é revestido com uma emulsão composta de propilenoglicol, óleo vegetal, cera vegetal, uréia e lecitina, além do melaço para que aumente a

palatabilidade do suplemento. Este documento difere da presente invenção pois não vitaminas, óleos essenciais e diferente tipo de surfactante.

[0031] O documento WO 2008/155536 A1 divulga um aditivo alimentar emulsionado para galinhas obtido pela mistura de água, emulsificante, solução de goma, princípios ativos de óleos essenciais (cinamaldeído, citral, eugenol, limoneno, timol e vanilina). Este documento difere da presente invenção por não utilizar conservante na emulsão, vitaminas, sais minerais e diferentes tipos de surfactantes.

[0032] O documento US 8,513,311 B2 refere-se a uma emulsão óleo em água (O/A) estabilizada por tensoativos em que as vesículas de óleo dispersas mostram uma estrutura de tamanho nanométrico usada para solubilizar os princípios ativos hidrófilos-lipófilos ou anfifílicos, como nutrientes, medicamentos ou produtos químicos a fim de fornecer uma nova funcionalidade. O documento difere da presente invenção pois não utiliza óleo essencial em sua composição e nem conservante alimentar.

[0033] O documento US 2006/0165735 A1 divulga uma emulsão de óleo em água (O/A), em particular, emulsões que ajudam a proteger os óleos da oxidação. A emulsão inclui componentes como ácidos graxos polinsaturados (ácido linolênico, estearidônico, araquidônico, eicosapentaenóico, docasapentaenóico e docosahexaenóico), presentes em óleos de peixe e plantas tais como algas, linhaça, colza, milho, soja, girassol, açafrão, palmeira, azeitona e canola. Também são adicionados emulsionantes como goma de xantana para estabilizar a emulsão. Este documento difere da presente invenção pois utiliza óleos fixos de sementes de plantas e goma de xantana como estabilizante, além de não terem sais minerais e vitaminas em sua composição.

[0034] O documento MX 2017000849 A refere-se a uma emulsão em forma de pó como um aditivo alimentar para animais, que consiste em um azeite de rícino etoxilado (também conhecido como ricinoleato de glicerol polietilenoglicol, que é um composto tensoativo/emulsionante admitido na lista de aditivos para nutrição animal), ésteres de polietilenoglicol e de ácido graxo e azeite de soja. Este

documento difere da presente invenção pelos óleos utilizados não serem essências, tipo de surfactante e conservante alimentar.

[0035] O documento AR 108487 A1 se refere a uma composição em forma de uma emulsão de óleo em água (O/A), que contém farinha de trigo e amido fisicamente modificado como estabilizante da emulsão. Os óleos utilizados para a emulsão incluem óleos de girassol, óleo de oliva, óleo de soja e a combinação destes óleos. Este documento difere da presente invenção pois, a emulsão não utiliza óleos essenciais, vitaminas, sais minerais e nem surfactantes como tween 80 e conservantes alimentares.

[0036] O documento WO 2015/028381 A1 refere-se a uma composição em forma de emulsão óleo em água (O/A), compreendendo um meio fisiológico aceitável, uma fase aquosa, uma fase oleosa, um óleo apolar não volátil à base de hidrocarboneto, um composto lipofílico pastoso, um polissacarídeo gelificante hidrofílico e uma mistura de surfactantes não iônicos compreendendo um éster de polialquilenoglicol de ácidos graxos, um éster de ácidos graxos de polialquilenoglicol e suas misturas, em uso no tratamento cosmético para hidratar um material de queratina humana, em particular a pele. A composição cosmética pode conter aditivos comuns em cosméticos como por exemplo pigmentos, corantes, agentes biológicos ativos (antienvhecimento, clareamento, antioxidantes etc.), protetores solares, hidratantes, amaciadores, vitaminas, conservantes, ou outros excipientes cosméticos. Este documento difere da presente invenção porque não utiliza óleos essenciais, sais minerais, o tipo de surfactantes diferente e se caracteriza como produto cosmético e não um aditivo alimentar para animais.

[0037] O documento US 2003/0170281 A1 refere-se a emulsões O/A de uso dermatológico, contendo ingredientes cosméticos como antiirritativos, antioxidantes, conservantes, bactericidas, corantes, surfactantes, emulsificadores, álcoois entre outros. Este documento também difere da presente invenção por não utilizar óleos essenciais, sais minerais e surfactantes e a via de administração é diferente.

[0038] O documento US 2002/0001601 A1 descreve uma emulsão estável à temperatura ambiente contendo combinações de óleo essencial de *Melaleuca*

alternifolia conhecida como árvore de chá (*Tea tree*), óleo de germen de trigo, manteiga de cacau, ceras de abelha, vitaminas A, D, e E, e emulsificantes como ácido esteárico, uma mistura de estearato de gliceril e estearato de polietilenoglicol 100 (estearato PEG 100), estearato 21, éter estearílico, polisorbato 20, álcool cetearílico, polisorbato 60, e outros emulsificantes similares. Este documento difere da presente invenção pois não utiliza a vitamina C e nem sais minerais como o fósforo em sua composição.

[0039] Diante do exposto nestes fundamentos da invenção, não foram encontradas informações no estado da técnica que divulguem os elementos contidos na presente invenção. Portanto os elementos descritos a seguir se apresentam como novos.

Breve descrição dos desenhos

[0040] As Figuras 1 (*Melaleuca alternifolia*) - M2 (M26) e 2 (*Citrus aurantium*) - C6 (C25) mostram a distribuição granulométrica das nanoemulsões formuladas a base desses óleos essenciais onde o tamanho médio das vesículas foi de $222,6 \pm 2,0$ e $105,1 \pm 2,0$ respectivamente mostrando homogeneidade na distribuição do tamanho das vesículas.

Descrição da invenção

[0041] Para fins desta invenção, os materiais lipídicos utilizados na formulação foram o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* também conhecido como, árvore de chá (em inglês *Tea tree*) que é um líquido límpido de odor característico, coloração que vai de amarelo palha ao amarelo claro, tendo terpinen-4-ol, 1,8-cineol e α -terpineno como principais princípios ativos após caracterização por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Ainda, também foi usado o óleo essencial de *Citrus aurantium var. dulcis* também chamado de laranja doce é um líquido límpido de odor cítrico doce e cor que vai de laranja ao amarelo, tendo o limoneno e mentol como principais princípios ativos após caracterização por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Estes óleos essenciais não são tóxicos podendo ser utilizados para diversos fins, na área cosmética, área farmacêutica humana, área veterinária com uso no tratamento e

prevenção de vários tipos de doenças bacterianas e fúngicas, e também estimula o sistema imunológico (HARIKRISHNAN et al., *Aquaculture*, v. 317, n.1-4, p.1-15, 2011; REVERTER et al., *Aquaculture*, v.433, p.50-61, 2014). Na presente invenção, os óleos essenciais serviram como agentes de encapsulação para incorporar nutrientes na formulação das nanoemulsões. Ainda estes óleos essenciais são comerciais e as respectivas espécies vegetais não são brasileiras.

[0042] Foram utilizados na produção das nanoemulsões, surfactantes selecionados do grupo dos ésteres de sorbitano etoxilados como monooleato de sorbitano 80 (span 80) e o polissorbato 80 (tween 80).

[0043] Para a conservação das nanoemulsões podem ser utilizados os parabenos, mais preferencialmente o propilparabeno. O álcool etílico absoluto foi utilizado como solubilizante para o parabeno. Outros solventes alcoólicos também podem ser usados.

[0044] Foram utilizados nutrientes hidrofílicos e lipofílicos compreendendo vitaminas e minerais, mais preferencialmente vitamina C, vitamina D, vitamina E e o fósforo. Estes nutrientes são comumente utilizados no processamento de rações para peixes e outras espécies animais (US 5,229,147 A; MARTINS et al., *Ciência Rural*, v.38, n.1, p.213-218, Santa Maria, 2008; ELWAKEEL et al., *Animal Feed Science and Technology*, 2019; MIRANDA et al., *Rev. bras. zootec.*, 29 (6): 2162-2171, 2000).

[0045] Para controle do pH, pode ser utilizada nas nanoemulsões, preferencialmente a solução tampão fosfato a 0,1 M pH 7,4. Outros agentes tamponantes para a faixa neutra podem ser utilizados como o PBS.

[0046] As nanoemulsões foram formuladas de acordo com as seguintes soluções: a) Fase aquosa formada preferencialmente pela solução tampão fosfato a 0,1 M, vitamina C e o fósforo submetida a uma agitação suave (500 rpm); b) Fase oleosa formada por óleos essenciais, preferencialmente o de *Melaleuca alternifolia* e de *Citrus aurantium* isolados, vitaminas D e E; c) Um conservante mais preferencialmente o propilparabeno dissolvido no álcool etílico absoluto.

[0047] A fase aquosa foi vertida por gotejamento na fase oleosa sob agitação suave (500 rpm) sendo, em seguida, adicionado à solução o conservante para a formação das nanoemulsões.

[0048] As nanoemulsões contendo óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Citrus aurantium* podem ser incorporadas individualmente ou associadas a rações extrusadas comerciais na forma líquida ou em pó passando por processos como liofilização ou *spray drying* com adição de crioprotetores como trealose, sacarose ou glicose para a formação de um aditivo alimentar nanotecnológico conforme detalhada nos exemplos. Esta ração contendo as nanoemulsões podem ser utilizadas para a alimentação de peixes como tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

[0049] As nanoemulsões foram produzidas em escala de bancada e caracterizadas de acordo com a descrição dos exemplos a seguir.

Exemplo 1: Processo de produção de nanoemulsões a base de óleos essenciais enriquecidos com vitaminas e sais minerais, adicionada à ração para Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

[0050] O processo de produção de nanoemulsões para um volume final de 10,00 gramas (g) seguiu as seguintes fases. a) Fase aquosa contendo 5,70 g a 8,17 g de solução tampão fosfato; 0,50 g a 2,75 g de polissorbato 80 (tween 80). Após uma agitação suave e constante (500 rpm) por 30 minutos, foi adicionado 0,25 g de fósforo e 0,3 g de vitamina C sob agitação suave e constante (500 rpm) para uma melhor homogeneização. b) Fase oleosa contendo 0,50 g de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e *Citrus aurantium* isolados; 0 a 0,25 g de monooleato de sorbitano 80 (spam 80); 0,08 g de vitamina D e 0,2 g de vitamina E. Adicionalmente foi preparada uma mistura contendo 0,04 g de conservante propilparabeno e 1 mL de álcool etílico absoluto, adicionada 5 minutos após a fase aquosa ser vertida na fase oleosa sob agitação (500 rpm), onde permaneceu por mais 5 minutos para a evaporação do álcool. Para a produção das nanoemulsões, ambas as fases foram submetidas a uma agitação suave e constante (500 rpm) por 30 minutos, sendo em seguida, a fase aquosa vertida por gotejamento na fase oleosa sob agitação suave e constante (500 rpm). 5 Minutos depois, foi adicionado o conservante propilparabeno,

onde permaneceu sob a mesma agitação (500 rpm) por mais 5 minutos para a evaporação do álcool. Ainda, foi aumentada a rotação para 700 a 800 rpm para melhor homogeneização da emulsão permanecendo por 30 a 45 minutos. Após a homogeneização, as nanoemulsões passaram 5 minutos em repouso. Foram avaliadas as características organolépticas da sua homogeneidade, e 24 horas após a formulação, foram submetidas aos testes de estabilidade acelerada.

Exemplo 2: Efeitos da variação nos níveis de surfactantes, solução tampão, tempo e velocidade de rotação sobre as nanoemulsões

[0051] Para a determinação das concentrações finais de surfactantes, solução tampão, tempo e velocidade ideal de rotação das nanoemulsões, foram utilizados níveis variáveis de surfactantes como tween 80, span 80, solução tampão fosfato, inclusive variação no tempo e velocidade de rotação com estes respectivos níveis descritos na Tabela 1. Estas diferentes nanoemulsões produzidas com os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Citrus aurantium* var. *dulcis* foram caracterizadas nos exemplos a seguir como índice de cremeação, características organolépticas, testes de estabilidade, características físico-químicas em diferentes tempos após a formulação como 0, 24 e 48 h. Ainda as nanoemulsões foram adicionadas a ração comercial extrusada simulando um produto real e ofertadas em um teste de palatabilidade usando a espécie tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

[0052] Tabela 1. Efeito de diferentes níveis de surfactantes, solução tampão, variação no tempo e velocidade de rotação utilizados na produção de nanoemulsões.

A	Q	S.T	T80	S80	V. C	V. D	V. E	P	V.R	T.R	Total
M1	0,5	8,17	0,5	0,0	0,3	0,08	0,2	0,25	800	30	10,00
(M25)	(5%)	(81,7%)	(5%)	(0%)	(3%)	(0,8%)	(2%)	(2,5%)			(100%)
M2	0,5	7,92	0,75	0,0	0,3	0,08	0,2	0,25	700	45	10,00
(M26)	(5%)	(79,2%)	(7,5%)	(0%)	(3%)	(0,8%)	(2%)	(2,5%)			(100%)
M3	0,5	7,67	1,0	0,0	0,3	0,08	0,2	0,25	800	45	10,00
(M27)	(5%)	(76,7%)	(10%)	(0%)	(3%)	(0,8%)	(2%)	(2,5%)			(100%)
M4	0,5	5,92	2,5	0,25	0,3	0,08	0,2	0,25	700	45	10,00
(M28)	(5%)	(59,2%)	(25%)	(2,5%)	(3%)	(0,8%)	(2%)	(2,5%)			(100%)
M5	0,5	5,7	2,75	0,25	0,3	0,08	0,2	0,25	700	45	10,00
(M29)	(5%)	(57%)	(27,5%)	(2,5%)	(3%)	(0,8%)	(2%)	(2,5%)			(100%)
C6	0,5	8,17	0,5	0,0	0,3	0,08	0,2	0,25	800	30	10,00

(C25)	(5%)	(81,7%)	(5%)	(0%)	(3%)	(0,8%)	(2%)	(2,5%)			(100%)
C7	0,5	7,92	0,75	0,0	0,3	0,08	0,2	0,25	700	45	10,00
(C26)	(5%)	(79,2%)	(7,5%)	(0%)	(3%)	(0,8%)	(2%)	(2,5%)			(100%)
C8	0,5	7,67	1,0	0,0	0,3	0,08	0,2	0,25	800	45	10,00
(C27)	(5%)	(76,7%)	(10%)	(0%)	(3%)	(0,8%)	(2%)	(2,5%)			(100%)
C9	0,5	5,92	2,5	0,25	0,3	0,08	0,2	0,25	700	45	10,00
(C28)	(5%)	(59,2%)	(25%)	(2,5%)	(3%)	(0,8%)	(2%)	(2,5%)			(100%)
C10	0,5	5,7	2,75	0,25	0,3	0,08	0,2	0,25	700	45	10,00
(C29)	(5%)	(57%)	(27,5%)	(2,5%)	(3%)	(0,8%)	(2%)	(2,5%)			(100%)

Valores apresentados em gramas para grama de emulsão e em % em peso.

Legenda: A = Amostra; M = *Melaleuca alternifolia*; C = *Citrus aurantium*; Q = Quantidade em gramas (g); S.T = Solução (g) Tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; T80 = Tween 80 (g); S80 = Span 80 (g); V = Vitamina (g); P = Fósforo (g); VR = Velocidade de Rotação (rpm); TR = Tempo de Rotação em minutos (min).

Exemplo 3: Determinação do índice de cremeação

[0053] Passados 48 horas após a produção das nanoemulsões, realizou-se o exame visual das amostras da Tabela 1, para a verificação se houve ou não separação de fases. Foi calculado o índice de cremeação utilizando a seguinte fórmula $C = 100 \times (Vs / Vt)$, sendo Vs , o volume da fase emulsionada e Vt , o volume total da amostra (FRANGE; GARCIA, *Rev.Ciê.Farm. Básica Apl.*, 30 (3): 263-271, 2009). As amostras C8, C9 e C10 apresentaram separação de fases tendo índice de cremeação de 50%, M4 e M5 também tiveram leve separação de fases com índice de cremeação de 95%, porém as amostras restantes M1, M2, M3, C6 e C7 não apresentaram separação de fases, tendo índice de cremeação de 100%.

Exemplo 4: Avaliação das características organolépticas

[0054] As nanoemulsões foram analisadas macroscopicamente e comparadas logo após 0, 24 e 48 horas da sua formulação. O estudo da estabilidade foi baseado no método proposto no Guia de Estabilidade sugerido pela Agência Nacional de vigilância Sanitária - ANVISA (vol.1, 1ª ed., 52p, Brasília, 2004), onde as amostras foram submetidas em condições que aceleram mudanças possíveis de ocorrer, permitindo obter informações sobre a estabilidade do produto em menor tempo possível.

[0055] As nanoemulsões foram caracterizadas de acordo com critérios como aspecto, a) Leitosa, translúcida ou apaca; b) homogênea ou heterogênea também classificado como normal, isto é, sem alteração, levemente separado ou separado e, c) fluida, levemente viscosa ou viscosa. Usando o critério cor, as nanoemulsões foram classificadas como normal, ou seja, sem alteração, levemente modificada, modificada ou intensamente modificada. E por último usando o critério odor, as amostras foram classificadas como normal ou sem alteração, levemente modificado, modificado ou intensamente modificado. Os resultados das análises preliminares realizadas logo após a formulação são apresentados na Tabela 2, demonstraram que M1, M2, M3, C6 e C7 ficaram estáveis sendo que as amostras M4, M5, C8, C9 e C10 ficaram levemente viscosas e levemente separadas.

[0056] Tabela 2. Características organolépticas resultantes dos diferentes níveis de surfactantes, solução tampão, velocidade e tempo de rotação na produção das nanoemulsões.

Amostra	Aspecto	Cor	Odor
M1 (M25)	Leitosa, fluida, homogênea, estável.	Sem alteração	Sem alteração
M2 (M26)	Leitosa, fluida, homogênea, estável.	Sem alteração	Sem alteração
M3 (M27)	Leitosa, fluida, homogênea, estável.	Sem alteração	Sem alteração
M4 (M28)	Translúcida, levemente viscosa, levemente separada.	Sem alteração	Sem alteração
M5 (M29)	Translúcida, levemente viscosa, levemente separada.	Sem alteração	Sem alteração
C6 (C25)	Opaca, fluida, homogênea, estável.	Sem alteração	Sem alteração
C7 (C26)	Opaca, fluida, homogênea, estável.	Sem alteração	Sem alteração
C8 (C27)	Translúcida, levemente viscosa, levemente separada.	Sem alteração	Sem alteração
C9 (C28)	Translúcida, levemente viscosa, levemente separada.	Sem alteração	Sem alteração
C10 (C29)	Translúcida, levemente viscosa, levemente separada.	Sem alteração	Sem alteração

Legenda: M = *Melaleuca alternifolia*; C = *Citrus aurantium*.

Exemplo 5: Teste de estabilidade (centrifugação)

[0057] A fim de avaliar a homogeneidade e a estabilidade das nanoemulsões, as amostras M1, M2, M3, C6 e C7 foram submetidas ao teste acelerado de centrifugação a 3000 rpm (1210 g) por 30 minutos (ANVISA, v.1, 1ª ed., 52p., Brasília, 2004). O teste foi realizado em tubos de ensaio graduado para a centrífuga modelo CE01 da Kaci, onde 1 mL de cada amostra acondicionada nos *eppendorfs*

foram submetidas a centrifugação a 3000 rpm (1210 g) por 30 minutos. Findo o processo, as amostras foram deixadas em repouso durante 30 minutos para posterior avaliação macroscópica da sua estabilidade, onde M1, M2 e M3 ficaram leitosas, fluídas, homogêneas e sem alteração de cor ou odor, as amostras C6 e C7 ficaram opacas, fluídas, homogêneas e sem alteração de cor ou odor, sendo todas consideradas estáveis.

Exemplo 6: Teste de estabilidade (Resfriamento e congelamento)

[0058] Após a formulação, as nanoemulsões foram submetidas a outro teste de estabilidade gelo/degelo, onde 1 mL das amostras M1, M2, M3, C6 e C7 foram acondicionadas nos *ependorfs* e deixadas na geladeira (Temperatura de 8 °C) e no freezer (Temperatura de - 20 °C), durante 24 horas. Após esse período, as amostras descansaram por 4 horas para posterior realização da leitura das características organolépticas, onde as amostras M1, M2, C6 e C7 deixadas no freezer se mantiveram estáveis, no entanto, M3 ficou levemente separada. As amostras M1, M2, M3 e C6 deixadas sob refrigeração também se mantiveram estáveis, sendo M3 e C7 opacas.

Exemplo 7: Teste de estabilidade (Aquecimento)

[0059] O teste de estabilidade por aquecimento em estufa foi realizado de modo a acelerar o aparecimento de sinais de instabilidade do produto. Para isso, 1 mL das amostras M1, M2, C6 e C7 acondicionadas nos *ependorfs* foram submetidas ao aquecimento em estufa a uma temperatura de 37 °C, 40 °C e 50 °C, durante 24 horas. Após esse tempo, as amostras descansaram por 4 horas para posterior avaliação macroscópica de sua estabilidade. Em 37 °C, as amostras se mantiveram estáveis sem alteração de sua homogeneidade, cor ou odor. Em 40 °C as amostras M1, M2 e C6 se mantiveram estáveis sem alteração de fases, cor ou odor, no entanto C7 ficou levemente separada. Por fim, em 50 °C as amostras M2 e C6 se mantiveram estáveis pois não houve alteração de sua homogeneidade, e M1 ficou levemente separada.

Exemplo 8: Análise microscópica

[0060] A homogeneidade das nanoemulsões também foi avaliada microscopicamente, onde as amostras M1, M2, C6 e C7 foram diluídas de 1:1 e 2:1 (água/amostra) e gotejadas em uma lâmina de vidro coberta com uma lamínula e submetidas a um aumento de 1000x em microscópio óptico sendo avaliadas a ocorrência de agregação das vesículas se as mesmas tivessem o tamanho micrométrico. Após avaliação, não foi observada agregações das vesículas das emulsões.

Exemplo 9: Análise das características físico-químicas das nanoemulsões

[0061] O tamanho médio das vesículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta das nanoemulsões M1, M2, C6 e C7 contendo vitaminas C, D e E, incluído o fósforo nanoencapsulados foram analisadas utilizando o equipamento ZetaSizer Nano-ZS90 (Malvern). As amostras foram previamente diluídas com água ultrapura tipo 1 na proporção de 1:50 (água: emulsão), e as medidas foram realizadas em triplicatas a 25 °C, onde os resultados foram expressos na Tabela 3 e nos gráficos 1 e 2.

[0062] Tabela 3. Análise das características físico-químicas das nanoemulsões

Amostra	Tamanho das vesículas	PDI	Potencial Zeta
M1 (M25)	162,2 ± 1,5	0,092 ± 0,033	-1,90 ± 0,16
M2 (M26)	222,6 ± 2,0	0,079 ± 0,002	-----
C6 (C25)	105,1 ± 2,1	0,218 ± 0,013	-1,79 ± 0,23
C7 (C26)	96,87 ± 1,4	0,276 ± 0,008	-----

Legenda: M = *Melaleuca alternifolia*; C = *Citrus aurantium*.

[0063] Pode-se observar nos resultados que as emulsões podem ser consideradas nanoemulsões já que apresentaram tamanho inferior a 300 nm. Entretanto houve variação no PDI sendo as melhores emulsões M2 e C6 por apresentarem menor PDI. A carga (potencial zeta) das emulsões ficou próximo do neutro.

Exemplo 10: Teste de palatabilidade com os animais

[0064] O teste de palatabilidade foi realizado a fim de mostrar a aceitação ou não da ração pelos animais. Este protocolo foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco licença 074/2019. As

nanoemulsões produzidas a base de óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Citrus aurantium* isolados, enriquecida com vitaminas C, D e E e o fósforo, foi adicionada à ração em diferentes níveis 0,5; 0,75 e 1 gramas de emulsão de ambos os óleos isolados. Primeiramente a ração comercial extrusada foi macerada e as emulsões foram previamente diluídas com água destilada, sendo adicionada à ração macerada lentamente na proporção de 2:1 (ração:água) até formar uma pasta. Após uma boa homogeneização, novos pelets foram produzidos e deixados em bandejas para a secagem durante 48 horas em temperatura ambiente e protegidas da luz solar. Após a secagem dos pelets a alimentação foi *ad libitum* 3 vezes ao dia, e mostrou ser palatável pois teve uma boa aceitação pelos juvenis da espécie tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

REIVINDICAÇÕES

1. “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ENRIQUECIDOS COM VITAMINAS E SAIS MINERAIS ADICIONADA À RAÇÃO PARA PEIXES” **caracterizado por** nanoemulsões água/óleo (A/O) com vesículas de tamanho inferior a 300 nm, formadas pela fase aquosa contendo solução tampão em pH neutro, polissorbato 80, sais minerais e vitaminas hidrossolúveis compreendendo fósforo e vitamina C, sendo esta fase aquosa vertida em uma fase oleosa sob agitação constante contendo óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Citrus aurantium*, monooleato de sorbitano 80, vitaminas lipossolúveis compreendendo vitamina D e vitamina E e conservante microbiológico, sendo estas nanoemulsões incorporadas como aditivos alimentares a rações comerciais para peixes.
2. “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ENRIQUECIDOS COM VITAMINAS E SAIS MINERAIS ADICIONADA À RAÇÃO PARA PEIXES”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** conservante microbiológico usado na preparação das nanoemulsões ser do grupo dos parabenos.
3. “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ENRIQUECIDOS COM VITAMINAS E SAIS MINERAIS ADICIONADA À RAÇÃO PARA PEIXES”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelas** nanoemulsões diluídas com água, como aditivos alimentares, poderem ser adicionadas a rações comerciais para peixes.
4. “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ENRIQUECIDOS COM VITAMINAS E SAIS MINERAIS ADICIONADA À RAÇÃO PARA PEIXES”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelas** nanoemulsões contendo óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Citrus aurantium* poderem ser incorporadas individualmente e associadas a rações comerciais para peixes.

RESUMO

“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ENRIQUECIDOS COM VITAMINAS E SAIS MINERAIS ADICIONADA À RAÇÃO PARA PEIXES”

O presente pedido de patente de invenção descreve o processo de produção de uma nanoemulsão A/O com tamanho de vesículas inferior a 300 nm contendo vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis, e sais minerais nanoencapsulados para ser adicionada à ração para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) como um aditivo alimentar. A nanoemulsão produzida contém óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e de *Citrus aurantium* isolados, uma solução tampão em pH neutro, surfactantes (tween e span 80), conservante do grupo dos parabenos, um álcool, vitaminas hidrossolúveis (vitamina C) e lipossolúveis (vitaminas D e E), sais minerais (fósforo). A nanoemulsão produzida pelo processo de emulsificação sob agitação constante, utiliza materiais biodegradáveis, podendo ser utilizada para encapsulação de nutrientes e incorporada na produção de ração animal.

DESENHOS

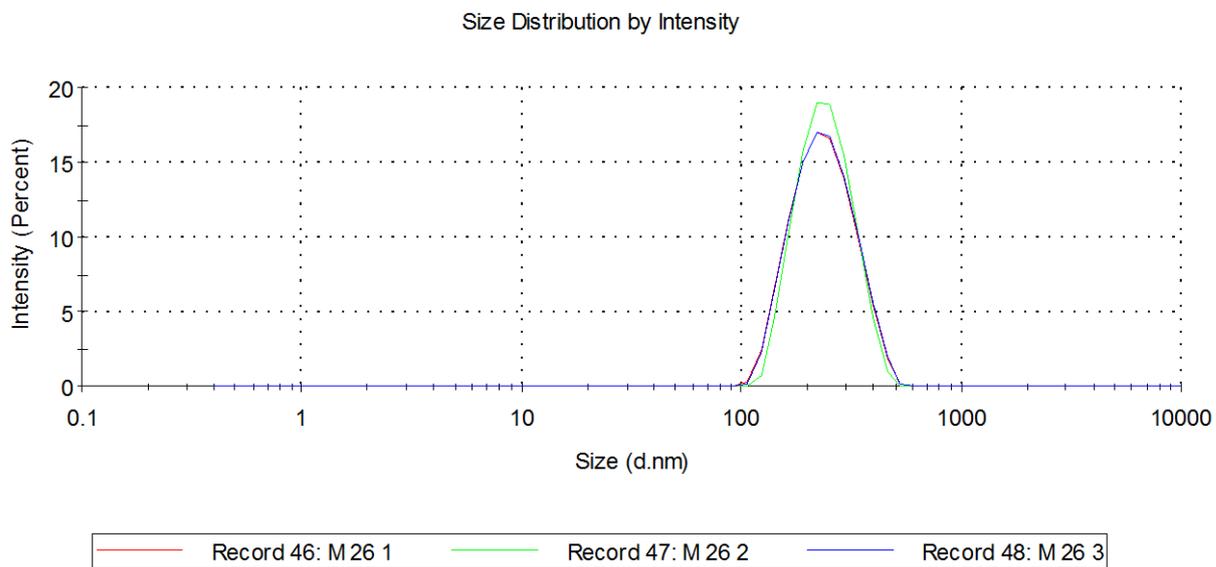


Figura 1.

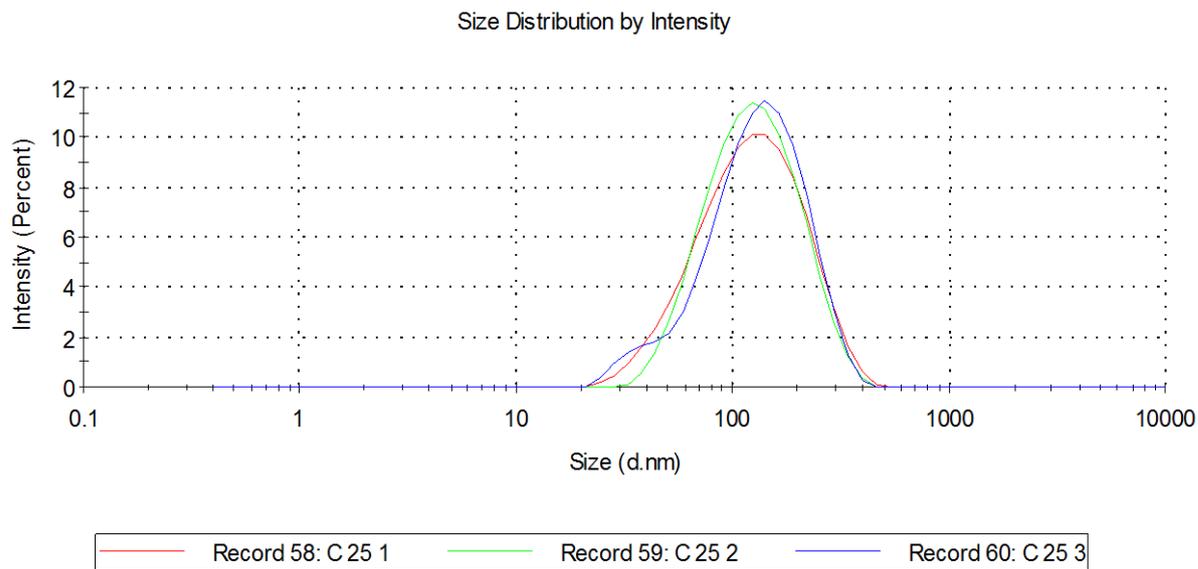


Figura 2.

Incorporação de nanoemulsão a base de óleos essenciais enriquecidos com vitamina C, D e E, Cálcio e Fósforo como aditivo alimentar em ração para peixes como tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Resumo

O presente trabalho foi desenvolvido com objetivo de produzir um aditivo alimentar contendo nanoemulsão simples água/óleo essencial (A/OE) enriquecidos com vitaminas C, D e E, e minerais Cálcio e Fósforo para peixes como tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Foram utilizados OEs de *Melaleuca alternifolia* (M) e *Citrus aurantium* (C) isolados. Foram realizadas triagens dos níveis de cada componente da emulsão, avaliação das características organolépticas e físico-químicas para definir a melhor nanoemulsão. Foi realizado teste de palatabilidade e testes com 10 grupos de tilápias, sendo o grupo controle G0 (0,0 g), M1, M2, M3, C1, C2, C3, M1C1, M2C2, e M3C3, com 0,5, 0,75 e 1,0 g de OE respectivamente, para 5 g de emulsão e 50 g de ração. Foi avaliado o comportamento e parâmetros zootécnicos dos animais. Foi possível produzir nanoemulsões com tamanho nanométrico ($105,1 \pm 2,1$ para C a $222,6 \pm 2,0$ nm para M), estáveis e demonstrada a sua palatabilidade quando adicionada à ração para tilápia com 100% de consumo pelos animais. Também foi depositado um pedido de patente. Os resultados dos eventos comportamentais dos grupos tratados revelaram não significativos ($p > 0,05$) ao G0, demonstrando que dietas suplementadas com OEs não apresentaram efeitos tóxicos aos peixes nos níveis testados. O ganho de comprimento, ganho de peso, taxa de crescimento específico e taxa de conversão alimentar não foram expressivos em grupos expostos ao G0 ($p > 0,05$). Houve melhoria na taxa de sobrevivência no

grupo C3 comparado ao G0 e aos demais. Com isso conclui-se que, foi possível produzir um aditivo alimentar palatável contendo nanoemulsão à base de OEs enriquecidos com vitaminas C, D e E, e minerais Cálcio e fósforo, para peixes como tilápia possivelmente com uso em escala industrial.

Palavras-Chave: Nutrição Animal, Nanotecnologia, Compostos Fitogênicos Aquicultura.

1. Introdução

A piscicultura é uma atividade mundialmente reconhecida e destacada por altos níveis de produção de alimento como fonte de proteína animal para a população humana. Atualmente vem sendo desenvolvida em vários países como a China, Equador, Índia, Chile, entre outros, incluindo o Brasil, este último consolidado como o 4º maior produtor do mundo (Peixe BR, 2020). A alta produtividade em piscicultura requer técnicas de manejo nutricional apropriado, apoiada às inovações tecnológicas, com uso de rações balanceadas ricas em nutrientes como vitaminas (C, D e E) e sais minerais (Cálcio e o Fósforo), para o máximo crescimento, com redução dos custos de produção e impactos ambientais (Miranda et al. 2000; Ribeiro et al. 2012). Nutrientes como a vitamina C e o fósforo, por serem hidrossolúveis facilmente se perdem na água pelo processo de lixiviação, dificultando o seu aproveitamento pelos peixes, desperdiçando a ração e aumentando o custo de produção. Por outro lado, excesso de nutrientes perdidos na água pode causar a eutrofização levando a redução do nível de oxigênio dissolvido e alterações das características organolépticas da carne (Toyama et al. 2000).

Todavia, com o avanço científico da nanotecnologia, é possível desenvolver sistemas de liberação controlada (SLCs) nanoestruturados capazes de proteger princípios ativos e transportar até ao local específico do trato gastrointestinal do peixe sem alterar as suas propriedades, mas aumentando a estabilidade e biodisponibilidade do produto (Souza et al. 2014; Alencar et al. 2018). Nanoemulsões podem ser utilizadas como SLCs para o encapsulamento de nutrientes na ração. As nanoemulsões são dispersões bifásicas de dois líquidos imiscíveis, um disperso no outro em forma de vesículas água-em-óleo (A/O) ou óleo-em-água (O/A) estabilizadas por um surfactante anfipático (Singh et al. 2017). Elas podem ser preparadas com óleos essenciais (OEs), pois são compostos fitogénicos, biodegradáveis e não representam perigo para os animais e o meio ambiente (Sutili, 2016, Cunha et al. 2018). Os compostos fitogénicos são substâncias derivadas de plantas medicinais que compreendem ervas, óleos essenciais extratos e óleo-resina, com efeitos positivos sobre a produção e saúde animal. OEs podem ser utilizados como alternativas à antibióticos e outros produtos convencionais usados em piscicultura que para além de mostrarem - se antieconómicos e ecologicamente prejudiciais (Steverding et al. 2005; Sutili, 2016), podem gerar resistência em bactérias patogénicas para animais, acumulando resíduos no músculo e afetando negativamente a saúde humana (Gastalho et al. 2014). OEs de *Melaleuca alternifolia* e *Citrus aurantium* apresentam propriedades parasiticidas (Steverding et al. 2005), bactericidas, antioxidantes, antimicrobianos, imunoestimulantes, anti-inflamatórios, promotores de crescimento, podendo ser usados em piscicultura principalmente em adição com a água, mas também adicionados na ração animal (Aanyu, 2016). Diante do exposto, torna-se necessário produzir um aditivo alimentar contendo

nanoemulsão simples A/OE enriquecidos com vitaminas C, D e E, e minerais Cálcio e Fósforo para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

2. Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal – LECA, biotério cadastrado na plataforma CIUCA- CONCEA (Conselho Nacional de Experimentação Animal), autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE (licença: 074/2019). Para a produção de nanoemulsões foram utilizados materiais lipofílicos como, OE de *Melaleuca alternifolia* (M), e OE de *Citrus aurantium var. dulci* (C), ambos da Ferquima Indústria & Comércio Ltda, vitaminas D (Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda) e E (Catalent Brasil Ltda). Por outro lado, os materiais hidrofílicos utilizados foram, solução tampão fosfato a 0,1 M pH 7,4, surfactante Polissorbato 80 (tween 80) (Química Contemporânea Ltda), vitamina C (Química Moderna) e o fosfato de potássio monobásico (Dinâmica Brasil). Ainda, foi utilizado um conservante propilparabeno (Química Contemporânea Ltda) e um solvente, o álcool etílico absoluto (Química Moderna).

2.1. Caracterização química dos óleos essenciais (OEs)

2.1.1 Produtos químicos

A caracterização química dos OEs foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNBio) – Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os produtos químicos utilizados na identificação dos compostos fitogênicos dos OEs de M e C, foram todos os monoterpenos (α -pineno, β -pineno, limoneno, linalol e 1,8-cineol), sesquiterpenos (β -cariofileno e α -humuleno) e fenilpropanóides (metil eugenol).

2.1.2 Cromatografia gasosa GC e GC-MS

As análises quantitativas de cromatografia gasosa (500 GC, PerkinElmer Clarus, Shelton, CO, EUA) foram realizadas usando um aparelho equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 não polar (30 mx 0,25 mm x 0,25 μ m) (J & W Scientific). A temperatura do forno foi programada de 60 a 240 °C a uma taxa de 3 °C min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector eram em 260 °C. O hidrogênio foi usado como o gás transportador a uma taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹ em modo dividido (1:30). O volume de injeção foi de 0,5 μ L de solução diluída (1: 100) de óleo em n-hexano. A quantidade de cada composto foi calculada a partir das áreas dos picos de GC na ordem da eluição da coluna DB-5 e expressa como uma porcentagem relativa da área total dos cromatogramas. As análises foram realizadas em triplicado.

A análise qualitativa de cromatografia gasosa-espetrometria de massas (GC-MS) (220-MS IT GC, Varian, Walnut Creek, CA, EUA) foi realizada em um sistema com detector seletivo de massas, espectrômetro de massas operando em EI 70 eV com intervalo de varredura de 0,5 S e fragmentos de 40 a 550 Da. equipado com a mesma coluna e programa de temperatura dos experimentos GC-FID, com os seguintes parâmetros: gás transportador = hélio; taxa de fluxo = 1 mL min⁻¹; modo de divisão (1:30); volume injetado = 1 μ L de solução diluída (1:100) de óleo em n-hexano.

2.1.3 Identificação dos compostos fitogênicos presentes nos OEs

A identificação dos compostos fitogênicos foi baseada em índices de retenção de GC-MS com referência a uma série homóloga de C8-C40 n-alcanos calculados usando a equação de Van der Dool; Kratz (1963) e por computador comparando

com a biblioteca espectral de massa do sistema de dados GC-MS (NIST 11 and WILEY 11th) e co-injeção com padrões autênticos, bem como outros espectros de massa publicados (Adams, 2007). As porcentagens de área foram obtidas electronicamente a partir da resposta do GC-FID sem o uso de um padrão interno ou fatores de correção.

2.2 Preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões foram identificadas como M1, M2, M3, C1, C2, C3, M1C1, M2C2 e M3C3 com o mesmo peso de OE 0,5, 0,75 e 1,0 g respectivamente para 5 g de emulsão. As nanoemulsões A/OE, foram preparadas em escala de bancada utilizando 5,0 a 10,0% (p/p) de OE de M e C; 5,0 a 7,5% (p/p) de Tween® 80; 74,2 a 81,7% (p/p) de solução tampão fosfato, sendo fixado os valores de vitamina C (3%), vitamina D (0,8%), vitamina E (2,0%) e fósforo (2,5%) (Tabela 1) (Miranda et al. 2000). A fase oleosa foi constituída de 5,0 a 10,0% (p/p) de OE de M e C isolados, 5,0 a 7,5% (p/p) de Tween® 80, 0,8% de vitamina D e 2,0% de vitamina E. Por outro lado, a fase aquosa foi formada por 74,2 a 81,7% (p/p) de solução tampão fosfato, 3% de vitamina C e 2,5% de fósforo (Tabela 1). Os componentes foram mensurados em uma balança semi-analítica, AD200. Ambas as fases (oleosa e aquosa) foram homogeneizadas em simultâneo de forma suave, com auxílio de um agitador magnético durante 30 minutos a 500 RPM em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Seguidamente e sob agitação (500 RPM), a fase aquosa foi vertida na fase oleosa com auxílio de uma bureta de vidro graduada classe A, que possui uma torneira na parte inferior, para regular o volume do gotejamento (duração: 1 minuto). A bureta foi fixada verticalmente em um suporte de madeira posicionada sobre o béquer para permitir o escoamento do fluido. Após 5 minutos em agitação para a formação da

nanoemulsão A/OE, foi adicionada uma mistura contendo 0,4% (p/p) de conservante propilparabeno dissolvido em 1 mL de álcool etílico absoluto, permanecendo em agitação por mais 5 minutos para a evaporação total do álcool. Por fim, a nanoemulsão permaneceu sob agitação por 45 minutos a uma velocidade de 800 RPM para obtenção de tamanho nanométrico. Após isso, foi realizada a caracterização macroscópica para a verificação de separação de fases.

2.2.1 Análise Física Macroscópica das Nanoemulsões

A avaliação das características organolépticas foram realizadas logo após 0, 24 e 48 horas da sua formulação e comparadas para obtenção do melhor resultado. As nanoemulsões foram analisadas acompanhando 3 critérios: I. Aspecto: a) Leitoso, Translúcido ou Opaco; b) Homogêneo ou Heterogêneo, também classificado como Normal/ Sem alteração, Levemente Separado ou Separado e, c) Fluido, Levemente Viscoso ou Viscoso. II. Cor: Normal/Sem Alteração, Levemente Modificada, Modificada ou Intensamente Modificada. III. Odor: Normal/Sem alteração, Levemente Modificado, Modificado ou Intensamente Modificado (Brasil, 2004; Frange; Garcia, 2009). As amostras aprovadas passaram para os testes de estabilidade preliminar.

2.2.2 Testes de Estabilidade Preliminar

Após a formulação, as nanoemulsões foram submetidas ao teste de centrifugação no LECA, realizado em tubos de ensaio graduado para a centrífuga CE01 Kacil, usando 1 mL de cada amostra acondicionada nos *ependorfs* e submetidas em condições de temperatura, tempo e velocidade padronizados, 3000 RPM (1210 g) por 30 minutos (Brasil, 2004; Viegas; Mendez, 2013). Aditivamente, outras amostras foram submetidas ao teste de resfriamento e congelamento em

temperaturas de (8 °C) na geladeira e (– 20 °C) no freezer durante 24 horas. Outras ainda, foram submetidas ao teste de aquecimento em estufa realizado em temperaturas de 37, 40 e 50 °C por um período de 24 horas (Brasil, 2004). Após todos os testes de estabilidade preliminar, as amostras foram observadas visualmente quanto a modificações passíveis de ocorrer, como separação de fases (2.2.1) (Viegas; Mendez, 2013). Ainda, as amostras foram diluídas na proporção de 1:1 e 2:1 (água/amostra), gotejadas em uma lâmina de vidro para a avaliação microscópica, em um microscópio óptico. As amostras aprovadas seguiram para a caracterização físico-química.

2.2.3 Análise físico-química das nanoemulsões

Análise físico-química foi realizada em Laboratórios Associados em Rede de Nanotecnologia (LARnano) – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O tamanho médio das partículas (nm), o índice de polidispersidade (PDI) e o potencial zeta (mV) das nanoemulsões, foram avaliados por espectroscopia de correlação de fótons padrão (PCS) em um ângulo fixo de 90° a 25 °C, usando o Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) (Cadena et al. 2013). Amostras previamente diluídas com água ultrapura tipo 1 com taxa de 1:50 (água: emulsão), foram colocadas em cubeta zeta, e as medidas foram realizadas em triplicado a uma temperatura de 25 °C.

2.3 Produção do aditivo alimentar

Ração comercial extrusada com 32% de Proteína Bruta, granulometria entre 4 e 6 mm (NUTRANE NUTRIÇÃO ANIMAL LTDA) (Tabela 2), triturada em um liquidificador de potência 1000 W na velocidade de 200 W, em seguida peneirada com uma peneira plástica foi utilizada como base para produção do aditivo alimentar. Para isso, no teste de palatabilidade, as nanoemulsões preparadas foram

previamente diluídas com água destilada e adicionada à ração macerada lentamente, na proporção de 2:1 (ração: água) até formar uma pasta, adicionalmente, durante a homogeneização foi incorporada 2,5% de cálcio na ração (este não foi incluído na emulsão devido a sua baixa solubilidade em água causando separação de fases). Seguidamente, após uma homogeneização, novos pelets foram produzidos manualmente utilizando pipetas de pasteur e deixados em bandejas para a secagem durante 48 horas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) e protegidas da luz solar. Para a experimentação, as nanoemulsões preparadas foram incorporadas na ração em pó, a uma taxa de 5:50 (emulsão: ração), juntamente com 2,5% de cálcio (Miranda et al. 2000). Após uma homogeneização, a ração foi colocada em placas devidamente identificadas para a desidratação em temperatura ambiente por um período de 24 horas. Posteriormente foi acondicionada em sacos plásticos e conservada em geladeira para uso na alimentação dos alevinos. Para evitar o manuseio frequente das dietas armazenadas sob refrigeração, quantidades suficientes para o uso em 6 dias eram armazenadas em *ependorfs* (com uma refeição em cada), e estes guardados em potes plásticos e mantidos sob refrigeração.

2.4 Animais

Juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) (peso 11,5 g) utilizados no teste de palatabilidade foram adquiridos na Estação de Aquicultura Continental Johei Koike da UFRPE e aclimatados por 15 dias. Larvas (idade: 2 dias) utilizadas no teste experimental foram obtidas na fazenda Piscicultura Vale da Mina, situada em Paulista – Pernambuco. Imediatamente à sua chegada foram aclimatadas por 60

minutos. Após o povoamento no aquário grande de 80 L, permaneceram por 3 dias para melhor aclimatação e monitoramento da saúde dos animais.

2.4.1 Teste de palatabilidade

O teste de palatabilidade com juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) (peso 11,5 g) foi realizado a fim de provar a aceitação ou não do aditivo alimentar pelos peixes, pois quanto maior a palatabilidade, mais fácil é o consumo do alimento. Para isso, a ração comercial extrusada com 32% de proteína bruta (NUTRANE NUTRIÇÃO ANIMAL LTDA) contendo nanoemulsões foi ofertada 3 vezes ao dia, no total de 2 dias. Durante o teste, não foi ofertada outro tipo de ração.

2.4.2 Administração do aditivo alimentar

Os animais foram separados em 10 grupos e acondicionados em 10 aquários de acrílico de 10 L com 20 animais em cada, temperatura média 25 ± 2 °C, pH 7,0 e aeração constante, onde permaneceram em aclimatação por 15 dias para melhor adaptação às novas condições de vida, sendo monitorado a saúde, a oxigenação e o nível de amônia. A troca parcial da água (4 L) foi realizada 2 vezes por semana através de uma sifonagem. Antes da manutenção era verificada o nível de amônia nos aquários utilizando kits comerciais da Alcon Labtest. A água utilizada nesse procedimento era preparada com adição de tiosulfato de sódio para redução do cloro, e hidróxido de cloro para a manutenção do pH em $7,0 \pm 0,5$, sendo este parâmetro verificado com auxílio de uma fita phmetro. Durante o período de aclimatação, os peixes foram arraçoados 4 vezes ao dia (8h, 10h, 12h e 14h) (Baba, et al. 2016) com ração controle (ração sem nanoemulsão). Os alevinos não apresentaram algum sinal de doença durante esse período, sendo posteriormente submetidos a primeira biometria utilizando image J para comprimento inicial ($1,32 \pm$

0,13 cm), e pesados em uma balança semi-analítica para obtenção do peso inicial ($0,053 \pm 0,022$ g). A mortalidade foi verificada diariamente, e indivíduos mortos eram retirados com auxílio de uma peneira plástica e registrados para análise de sobrevivência final. Na primeira quinzena, as rações contendo nanoemulsões foram ofertadas aos animais 4 vezes ao dia em horários fixos para que habituassem a hora da refeição (8, 10, 12 e 14 h) (Baba et al. 2016), e na segunda quinzena foi aumentado o número de vezes passando para 5 vezes ao dia (8, 10, 12 14 e 16 h). A quantidade de ração fornecida foi calculada 20% do peso vivo (Mainardes-Pinto, et al. 2000), sendo o peso da emulsão não contabilizado neste cálculo garantindo a mesma quantidade de proteína (32%) e mesmo grau de pureza da ração sem nanoemulsão.

2.5 Comportamento Animal

Durante o período experimental foram avaliados os comportamentos dos peixes utilizando o etograma modificado (Tabela 3) de Silva et al. (2018), e método *Ad libitum* de Altmman, (1974). O etograma foi construído a partir das observações realizadas pelo método de *scan sampling* (Altmman, 1974), para 3 categorias comportamentais, Alimentação, Social (agonístico) e Locomoção (Tabela 3). Essas observações foram realizadas por 10 dias, 2 vezes na semana durante 30 dias de exposição. A coleta de dados comportamentais pelo método de varredura instantânea foi efetuada durante 30 minutos, 1 minuto de observação e 1 minuto de intervalo a uma distância de 2,5 m, para não influenciar na exibição comportamental.

2.6 Desempenho Zootécnico

Ao final do experimento (30 dias), os animais foram eutanasiados através do banho de imersão com uma solução alcoólica anestésica (Eugenol 300 mg/L

dissolvidos em 1 mL de álcool absoluto) (Vidal et al., 2008). Os animais foram contabilizados e mensurados utilizando um paquímetro analítico. A taxa de sobrevivência foi calculada usando a fórmula, $S (\%) = (\text{número final de peixes} / \text{número inicial de peixes}) * 100$. O comprimento total foi mensurado da extremidade anterior da boca do peixe até a extremidade posterior da cauda, utilizando um paquímetro inox (Tods club comércio de ferram. util. Ltda). Para o ganho de comprimento foi calculado com a seguinte fórmula $GC = (\text{comprimento final do peixe} - \text{comprimento inicial do peixe})$. Para a determinação do peso final utilizou-se uma balança semi-analítica. O ganho de peso foi calculado com a fórmula, $GP (\text{peso final do peixe} - \text{peso inicial do peixe})$ (Melo, 2015). Para a taxa de crescimento específico foi usada a fórmula, $TCE (g/dia) = 100 * ((\text{peso final do peixe} - \text{peso inicial do peixe}) / \text{dias experimentais})$. A taxa de conversão alimentar foi calculada com a fórmula, $TCA = \text{consumo de ração} / \text{ganho de peso}$ (Baba et al. 2016).

2.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados em forma de média e desvio padrão sendo submetidos a testes de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados normais referentes aos dados comportamentais foram analisados por *one-way* ANOVA, quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Para os dados não paramétricos, os resultados foram comparados pelo teste de Kruskal Wallis. Em todos os casos, foi considerado um nível de significância de $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise GC e GC-MS dos OEs de M e C

A Tabela 4 e Figura 1, mostra os compostos fitogênicos dos OEs de M e C, analisadas por GC e GC-MS, e as respectivas porcentagens. As análises feitas para

ambos, identificaram 26 compostos fitogênicos representados por mono e sesquiterpenos, sendo identificados 16 no OE de M, o que representou 98,29% da sua composição total, e ainda, 16 no OE de C, representando 97,52%. Os principais compostos fitogênicos detectados foram, o terpinen-4-ol (45,92%) em *Melaleuca alternifolia* e limoneno (75,15%) em *Citrus aurantium*. Estes, irão determinar as propriedades químicas de cada OE.

3.2 Análise Física Macroscópica das nanoemulsões

As nanoemulsões produzidas com OEs de *Melaleuca alternifolia* e *Citrus aurantium*, foram analisadas macroscopicamente em relação ao seu aspecto, cor e odor. As nanoemulsões de M1, apresentaram um aspecto leitoso, fluido e homogêneo, por outro lado, as produzidas com OE de C1, apresentaram um aspecto opaco, fluido e homogêneo. Portanto, as amostras seguiram aos testes de estabilidade preliminar.

3.3 Testes de Estabilidade Preliminar

Para confirmar a homogeneidade e a estabilidade das nanoemulsões, as amostras foram submetidas aos testes de estabilidade preliminar. Segundo Anvisa, (2004), é essencial que as amostras passem por condições que aceleram mudanças passíveis de ocorrer, permitindo obter informações sobre a estabilidade do produto em menos tempo possível. Comumente as amostras foram submetidas a centrifugação, aquecimento em estufas, ciclos alternados de resfriamento e aquecimento. No presente trabalho, as nanoemulsões de M e C, foram submetidas as condições de estresse descritas acima, onde M1 permaneceu com aspecto leitoso, fluido e homogêneo e C1 com aspecto opaco, fluido e homogêneo. Ambas

as emulsões permaneceram estáveis e homogêneas, sem alterações de sua cor e odor, sendo posteriormente submetidas à análise físico-química.

3.4 Análise Físico-Química

Conforme os resultados obtidos no zetasizer, a análise físico - química revelou que as amostras M1 e C1, foram consideradas melhores nanoemulsões em relação às outras amostras, pois apresentaram tamanhos de partículas inferiores a 300 nm (*Melaleuca alternifolia* = $222,6 \pm 2,0$ e *Citrus aurantium* = $105,1 \pm 2,1$), menor PDI ($0,079 \pm 0,002$ e $0,218 \pm 0,013$ respectivamente), sendo o valor da carga potencial zeta próximo ao neutro.

3.5 Manejo dos Animais

Durante o período experimental (30 dias), a água dos aquários apresentou uma faixa de pH $7,0 \pm 0,5$ sendo considerado normal para a espécie em questão. O nível de amônia tóxica foi de $0,001 \pm 0,000$ ppm em todos os grupos, encontrando - se dentro da faixa de conforto. Em relação ao teste de palatabilidade realizado em juvenis, demonstrou que a dieta foi palatável pois teve uma boa aceitação pelos animais, não sendo verificado sobras de ração nos aquários. Cunha et al. (2018), enfatizou o uso de emulsões produzidas com OEs, pois ajudam a melhorar a palatabilidade da ração e aumentar a sobrevivência dos peixes graças as suas propriedades.

3.6 Comportamento Animal

Nos dados obtidos a partir do método *ad libitum* (Altmann, 1974) para a elaboração do etograma, foram identificados 13 padrões comportamentais agrupados em 3 categorias: Alimentação, Social e Locomoção observados na Tabela 5, onde inclusive as médias dos eventos foram resumidas. Os resultados dos

grupos tratados não foram significativos ($p > 0,05$) comparado ao controle, sendo satisfatórios pois indicam que os OEs de M e C nos níveis testados não interferiram nos eventos comportamentais, indicando que o produto não apresenta toxicidade para a espécie em análise utilizando o comportamento como indicador de saúde dos animais, sendo também utilizado para estudos de fisiologia (Snowdon, 1999), e para compreender as interações entre eles e com o meio ambiente. A tilápia sendo uma espécie territorialista, ela briga pelo espaço definindo hierarquias no grupo, podendo existir peixes dominantes os que têm vantagens sobre os outros, e submissos os que estão em posição inferior, de acordo com sua capacidade de competir com outros indivíduos do grupo. Esses confrontos agonísticos podem estressar os peixes e resultar em crescimento heterogêneo, que segundo Correia et al. (2018), podem ser minimizados com adoção de dietas contendo OE de M.

3.7 Desempenho Zootécnico

Os resultados dos parâmetros zootécnicos dos alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) ao final de 30 dias de exposição, são apresentados na Tabela 6. O ganho de comprimento (GC), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE) e a taxa de conversão alimentar (TCA), não foram significativos ($p > 0,05$) em grupos alimentados com dietas experimentais contendo OE de M e C comparado ao grupo controle. Estes resultados indicaram que os parâmetros zootécnicos dos peixes não foram afetados pelos níveis formulados dos OEs em comparação ao controle. Resultados semelhantes foram encontrados por Baba et al. (2016), onde o desempenho de crescimento de *Oreochromis mossambicus* não foi significativo em peixes alimentados com dieta contendo OE cítrico comparado ao controle, mesmo entre os grupos experimentais. Estudos anteriores revelaram um

aumento no desempenho zootécnico quando OEs cítricos são incluídos nas dietas de *O. mossambicus* (Acar et al. 2015) e *Truta arco-ires* (Gultepe, 2018), este último com piora na taxa de conversão alimentar. Diferenças nos potenciais de crescimento, podem estar relacionadas com a concentração do ativo do próprio fitogênico e do seu nível de inclusão. A porcentagem do limoneno do OE cítrico utilizado no presente trabalho foi de 75,15%, ao passo que nos estudos citados foi de 94,74%. Segundo Steverding et al. (2005), o OE de M é eficaz em tratar doenças principalmente quando adicionado na água, promovendo o crescimento dos animais. No entanto seu efeito quando adicionado em dietas de peixes é escasso. Em relação ao sinergismo dos óleos, resultados semelhantes foram relatados por Aanyu, (2016), combinando o limoneno (400 ppm) e timol (500 ppm) onde não foram relatados efeitos sinérgicos sobre o crescimento de juvenis de tilápia-do-Nilo, porém quando os mesmos são usados de forma isolada, promove o crescimento desses animais. Pesquisas sugerem que combinações de diferentes OEs tenham um maior aumento do crescimento do que quando utilizado isoladamente em dietas. Porém considerando mudanças na concentração dos compostos fitogênicos fica difícil realizar uma comparação direta dos resultados. Diferenças nas concentrações dos compostos fitogênicos em diferentes trabalhos, são explicadas pelo facto de o material ser extraído em diferentes partes da planta, ou espécie, período de colheita, estágio de desenvolvimento, tempo de armazenamento forma de processamento e o processo de extração (Aanyu et al. 2018). Diante disso, os possíveis benefícios da dieta com nanoemulsões de OEs estão concentrados nos parâmetros bioquímicos e fisiológicos dos animais (Baba et al. 2016; Valladão, 2018, Shah; Mraz, 2020).

A taxa de sobrevivência foi maior (90%) em grupo alimentado com 1,0% de OE de *Citrus aurantium* comparado ao G0, e aos demais grupos, sendo considerado normal de acordo com Marengoni et al. (2013) e Brito; Silva, (2014). As mortes verificadas nos aquários (10 a 25% de mortalidade) foram devido ao canibalismo que é típico da espécie em estudo, principalmente nas fases pós-larvas e alevinagem, sendo consideradas normais de acordo com Shalaby et al. (2006). Kubitza, (2009), recomenda o consumo de 4 a 6 refeições ao dia e próximo a saciedade para minimizar potenciais perdas de alevinos por canibalismo, e isso foi feito em nosso experimento. Além de que, Acar et al. 2015, recomenda dietas contendo OEs para redução das taxas de mortalidade. Provavelmente o maior benefício do uso de nanoemulsões de OEs incorporadas a rações como aditivos alimentares seja o aumento na sobrevivência dos animais.

4. Conclusão

Perante os resultados obtidos no presente trabalho conclui-se que, foi possível produzir nanoemulsões simples A/O estáveis à base de óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Citrus aurantium*, com vitaminas C, D e E, minerais Cálcio e fósforo encapsulados, e realizar a avaliação da sua estabilidade. Foi possível produzir um aditivo alimentar, que se mostrou palatável pois teve uma boa aceitação pela espécie tilápia. Os parâmetros comportamentais não foram significativos em todos os tratamentos demonstrando que, dietas suplementadas com estes OEs não revelaram efeitos tóxicos aos peixes nas condições testadas. Parâmetros zootécnicos revelaram que os OEs de M e C aumentaram as taxas de sobrevivência dos animais. Diante disso, recomendamos o uso do aditivo nanotecnológico em escala industrial.

5. Agradecimentos

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, a CAPES pela bolsa de estudos, a Empresa Piscicultura Vale da Mina pela doação dos animais. Ao CNPq processo 310401/2017-8.

6. Referências Bibliográficas

- Aanyu, M., Effects of phytogetic compounds on growth and nutritional physiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), Institute of Aquaculture, School of natural Sciences, United Kingdom, 2016.
- Aanyu, M.; Betancor, M. B.; Monroig, O., Effects of dietary limonene and thymol on the growth and nutritional physiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Aquaculture*, 488, 217-226, 2018.
- Acar, U.; Kesbiç, O. S.; Yilmaz, S.; Gultepe, N.; Turquer A., Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*, *Aquaculture*, 437, 282-286, 2015.
- Adams, R. P., Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, 4th ed. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Illinois, 804p, 2007.
- Alencar, G. O. et al. Revisão. Liberação Prolongada de Fármacos e suas aplicações Farmacológicas, *Rev. e-ciência*, v.6, n.1, p.5-10, 2018.
- Altmann, J. Observational study of behavior: sampling methods. *Behavior*, v.48, p.227-267, 1974.

- Baba, E.; Acar, U.; Ontas, C.; Kesbiç, O. S.; Yilmaz, S., Evaluation of Citrus limon peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) challenged with *Edwardsiella tarda*, *Aquaculture*, 465, 13-18, 2016.
- Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. 1. ed. v. 1, 52 p. Brasília, 2004.
- Brito, T. M. D.; Silva, A. M. C., Tilapia survival rate (*Oreochromis niloticus*) in decantation tank with brackish waters on intensive growing system, *Acta Fish. Aquat. Res.*, (2): 40-50, 2014.
- Cadena, P. G.; Perreira, M. A.; Cordeiro, R. B. S.; Cavalcanti, I. M. F.; Barros Neto, B.; Pimentel, M. C. C. B.; Lima Filho, J. L.; Silva, V. L.; Magalhães, N. S. S., Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828: 309-316, 2013.
- Correia, A. M.; Pedrazzani, A. S.; Mendonça, R. C.; Massucatto, A.; Ozório, R. A.; Tsuzukia, M. Y., Brasil, tea tree and clove essential oils as analgesics and anaesthetics in *Amphiprion clarkii* (Bennett, 1830), *Braz. J. Biol.*, v.78, n.3, p.436-442, 2018.
- Cunha, J. A.; Heinzmann, B. M.; Baldisserotto, B., Review. The effects of essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens, *J. of Applied Microbiology*, 125, 328-344, 2018.
- Frange, R. C. C.; Garcia, M. T. J., Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. *Rev. de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 30, n. 3, p. 263-271, Brasil, 2009.

- Gastalho, S.; Silva, G. J.; Ramos, F., Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, v. 3, n.1, p.29-45, 2014.
- Gultepe, N., How the Use of Orange (*Citrus sinensis*) Peel Essential oil Affected the Growth Performance of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)? *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 75 (1) / 2018.
- Kubitza, F. Manejo alimentar e nutricional, *Panorama da aquicultura*, v.19, n.111, 2009.
- Lima, B. T. M., Adição de óleo de *Citrus sinensis* na dieta de tilápia-do-Nilo: desempenho produtivo, perfil hematológico e atividade respiratória de leucócitos, *Dissertação*, 2015.
- Mainardes-Pinto, C. S. R.; Fenerich-Verani, N.; Campos, B. E. S.; Silva, A. L., Masculinização da Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, utilizando diferentes rações e diferentes doses de 17 α -Metiltestosterona, *Rev. bras. zootec.*, 29 (3): 654-659, 2000.
- Marengoni, N. G., Mota, F. L. S., Gomes, R. B., Basílio, F. F. F., Oliveira, N. T. E. & Ogawa, M., Qualidade física e química da água em sistema fechado de recirculação durante o cultivo de juvenis de tilápia-do-Nilo. *Sem. Ciê. Agrárias*, 34(2): 927-934, 2013.
- Melo, N., Suplementação de óleo essencial de orégano em dietas para pós-larvas de jundiá (*Rhamdia sp*): Avaliação do desempenho zootécnico, *TCC*, 2015.
- Miranda, E. C.; Pezzato, A. C.; Pezzato, L. E.; Graner, C. F.; Rosa, G. J.; Pinto, L. G. Q., Relação Cálcio/Fósforo Disponível em Rações para Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), *Rev. Bras. Zootec.*, 29 (6):2162-2171, 2000.

- Peixe BR. Anuário Brasileiro da Piscicultura, 2020.
- Ribeiro, P. A. P.; Melo, D. C.; Costa, L. S.; Teixeira, E. A., Manejo nutricional e alimentar de peixes de água doce, 2012.
- Shah, B. R.; Mraz, J., Reviews. Advances in nanotechnology for sustainable aquaculture and fisheries, *Aquaculture*, 12, 925–942, 2020.
- Shalaby A. M.; Khattab Y. A.; Abdel Rahman A. M., Effects of garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* V.12, n.2, p.172-201, 2006.
- Silva, M. C. G.; Silva, S. C. B. L.; Santos, T. P.; Soares, P. R. L.; Andrade, A. L. C.; Cadena, M. R. S.; Cadena, P. G., Avaliação do impacto causado pela disponibilidade de 17 β -estradiol livre ou complexado à β -ciclodextrina no ambiente aquático sobre *Oreochromis niloticus* (tilápia), *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.70, n.1, p.222-230, 2018.
- SINGH, Y.; Meher, J. G.; Raval, K.; Khan, F. A.; Chaurasia, M.; Jain, N. K. Chourasia, M. K., Nanoemulsion: Concepts development and applications in drug delivery, *J. Controlled Release*, v.252, p.28-49, 2017.
- Snowdon, T.C., O significado da pesquisa em Comportamento Animal. *Estud. Psicol.*, v.4, p.365-373, 1999.
- Souza, M. E.; Lopes, L. Q. S.; Vaucher, R. A.; Mário, D. N.; Alves, S. H.; Agertt, V. A.; B. Bianchini, V.; Felicidade, S. I.; Campus, M. M. A.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Santos, C. G.; Raffin, R. P.; Gomes, P.; Santos, R. C. V., Antimycobacterial and antifungal activities of *Melaleuca alternifolia* oil nanoparticles, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 24 (5) 559-560, 2014.

- Steverding, D., Morgan, E., Tkaczynski, P., Walder, F., Tinsley, R.; Effect of Australian tea tree oil on *Gyrodactylus* spp. infection of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*; *Diseases of aquatic organisms*, v.66, p.29–32, 2005.
- Sutili, F. J., Óleos Essenciais de plantas como alternativas aos fármacos convencionais na produção de peixes, Tese, 2016.
- Thangaraj, S.; Seethalakshmiint, M., Microencapsulation of Vitamin C through Extrusion Process, *J. Adv. Res. Biol.Sci.* 1(7): 16–21, 2014.
- Toyama, G. N.; Corrente, J. E.; Cyrino, J. E. P., Suplementação de vitamina C em rações para reversão sexual da tilápias-do-nilo, *Scie. Agricola*, v.57, n.2, p.221-228, 2000.
- Valladão, G. M. R., Óleos essenciais de plantas na dieta de tilápia-do-Nilo: efeitos sobre a saúde, morfologia intestinal e microbiota, Tese, v.136, 2018.
- Van Den Dool, H.; Kratz, P. D., A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *J. Chromatogr. A*, v.11, p.463-471, 1963;
- Vidal, L. V. O.; Albinati, R. C. B.; Albinati, A. C. L.; Lira, A. D.; Almeida, T. R.; Santos, B. G., Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo, *Pesq. agropec. bras.*, v.43, n.8, p.1069-1074, 2008.
- Viegas, C. R.; Mendez, A. S. L., Avaliação preliminar da estabilidade de emulsões não iônicas contendo ácido kójico a 2,0 % manipuladas em farmácias magistrais, *Infarma - Ciências farmacêuticas*, v.25, n.4, 2013.

Tabela 1. Componentes utilizados na produção das nanoemulsões.

Óleo	Qnt.	S. T.	T. 80	V. C.	V. D.	V. E.	P.	V. R.	T. R.	Total
M1	0,50 (5,0%)	7,92 (79,2%)	0,75 (7,5%)	0,30 (3,0%)	0,08 (0,8%)	0,20 (2,0%)	0,25 (2,5%)	800	45	10 (100%)
M2	0,75 (7,5%)	7,67 (76,7%)	0,75 (7,5%)	0,30 (3,0%)	0,08 (0,8%)	0,20 (2,0%)	0,25 (2,5%)	800	45	10 (100%)
M3	1,00 (10,0%)	7,42 (74,2%)	0,75 (7,5%)	0,30 (3,0%)	0,08 (0,8%)	0,20 (2,0%)	0,25 (2,5%)	800	45	10 (100%)
C1	0,50 (5,0%)	8,17 (81,7%)	0,50 (5,0%)	0,30 (3,0%)	0,08 (0,8%)	0,20 (2,0%)	0,25 (2,5%)	800	45	10 (100%)
C2	0,75 (7,5%)	7,92 (79,2%)	0,50 (5,0%)	0,30 (3,0%)	0,08 (0,8%)	0,20 (2,0%)	0,25 (2,5%)	800	45	10 (100%)
C3	1,00 (10,0%)	7,67 (76,7%)	0,50 (5,0%)	0,30 (3,0%)	0,08 (0,8%)	0,20 (2,0%)	0,25 (2,5%)	800	45	10 (100%)
M1C1	0,50 (5,0%)	7,92 (79,2%)	0,75 (7,5%)	0,30 (3,0%)	0,08 (0,8%)	0,20 (2,0%)	0,25 (2,5%)	800	45	10 (100%)
M2C2	0,75 (7,5%)	7,67 (76,7%)	0,75 (7,5%)	0,30 (3,0%)	0,08 (0,8%)	0,20 (2,0%)	0,25 (2,5%)	800	45	10 (100%)
M3C3	1,00 (10,0%)	7,42 (74,2%)	0,75 (7,5%)	0,30 (3,0%)	0,08 (0,8%)	0,20 (2,0%)	0,25 (2,5%)	800	45	10 (100%)

Valores apresentados em gramas para grama de emulsão e em % em peso. Legenda: M = *Melaleuca alternifolia*; C = *Citrus aurantium*; Qnt = Quantidade em gramas (g); S.T. = Solução (g) Tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; T.80 = Tween 80 (g); V = Vitamina (g); P = Fósforo (g); V.R.= Velocidade de Rotação (RPM); TR = Tempo de Rotação em minutos (min).

Tabela 2. Nutrientes da ração (Nutrane Nutrição Animal Ltda).

Níveis de nutrientes por Kilo de ração	
Proteína Bruta	320,00 g
Cálcio	25 - 35,00 g
Fósforo	9 g
Vitamina C	0,2 g
Vitamina D	840,00 UI
Vitamina E	33,60 g

Tabela 3. Etograma modificado de Silva et al. (2018), dos alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*).

Evento	Sigla	Descrição
Categoria Alimentação		
Forragear em baixo	FE	O peixe nada no fundo do aquário próximo ao substrato e posiciona-se de forma vertical procurando partículas de alimento no substrato.
Forragear no Filtro	FF	O animal nada próximo ao filtro procurando partículas de ração presas sobre o filtro.
Procurar	PR	O peixe se aproxima a lâmina d'água, e nada sobre a parede do aquário procurando alimento.
Capturar	CA	O indivíduo nada em direção ao alimento que se encontra na lâmina d'água e usando um movimento rápido com a boca faz apreensão do alimento na superfície e volta rapidamente ao corpo d'água, repetindo mais vezes.
Categoria Social		
Afugentar	AF	O indivíduo agressor eriçava as barbatanas dorsais podendo provocar o afastamento do oponente no local ou ataque nas laterais do corpo, e estabelecimento da hierarquia dentro do grupo social.
Perseguir	PE	O animal nada seguindo o oponente, acompanhando o seu trajeto, enquanto o outro foge em submissão ao perseguidor, podendo ou não haver contato entre ambos.
Fugir	FU	O peixe perseguido se afasta do oponente que o persegue ou ataca, podendo ficar isolado em um pequeno espaço.
Categoria Locomoção		
Nadar Lento	NL	O peixe movimenta lentamente a nadadeira caudal permitindo o seu deslocamento de maneira lenta.
Nadar Rápido	NR	O peixe movimenta rapidamente a sua nadadeira caudal fazendo com que se desloque o mais rápido possível no corpo d'água.
Nadar Junto	NJ	Ato em que dois ou mais peixes nadam na mesma direção, exibindo o comportamento de cardume que é típico da espécie em questão.
Submergir	SU	O animal nada em direção ao substrato.
Emergir	EM	O animal nada em direção a superfície da lâmina d'água podendo ingerir partículas de alimento ou ar atmosférico.
Parado	PA	O indivíduo simplesmente permanece parado.

Tabela 4. Compostos fitogênicos dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Citrus aurantium* var. *Dulci*.

Composto	IR ^a	IR ^b	<i>M. alternifolia</i>	<i>C. aurantium</i> var. <i>dulcis</i>
α-Thujene	922	924	-	0,18
α-Pinene	928	932	2,07	1,11
Sabinene	970	969	-	0,47
β-Pinene	976	974	0,88	1,96
Myrcene	990	988	0,55	0,13
iso-Sylvestrene	1010	1007	1,56	-
α-Terpinene	1015	1014	12,78	-
Limonene	1026	1024	-	75,15
1,8-Cineole	1027	1026	11,32	-
β-Z-Ocimene	1031	1032	3,70	0,37
γ-Terpinene	1055	1054	7,90	0,63
Terpinolene	1089	1086	1,66	-
Linalool	1099	1095	-	0,43
Terpinen-4-ol	1180	1174	45,92	0,28
α-Terpineol	1188	1186	5,41	-
γ-Terpineol	1198	1199	0,35	-
cis-β-Terpineol	1144	1140	-	3,30
Citronellal	1149	1148	1,00	1,85
Menthol	1167	1167	-	7,44
E-isocitral	1173	1177	-	0,47
iso-Menthol	1200	1197	-	
Citronellol	1226	1223	-	0,95
Pulegone	1235	1233	0,81	-
β-Caryophyllene	1419	1417	1,26	-
α-Humulene	1455	1452	1,12	-
β-Bisabolene	1770	1768	-	2,80
Total			98,29	97,52

^a Índices de retenção calculados a partir dos tempos de retenção em relação aos de uma série de n-alcenos em uma coluna capilar DB-5 de 30m. ^b Índices de retenção linear da literatura. IR = índice de retenção, DP = desvio padrão, MS = espectro de massa, IC = co-injeção com padrões autênticos.

Tabela 5. Eventos comportamentais de tilápia-do-Nilo durante 30 dias experimentais. Eventos exibidos: FE – Forragear em baixo; FF – Forragear no filtro; PR - Procurar; CA - Capturar; AF – Afugentar; PE - Perseguir; FU - Fugir; NL - Nadar lento; NR - Nadar rápido; NJ - Nadar junto; SU – Submergir; EM – Emergir; PA – Parado. Os grupos experimentais foram comparados por one-way ANOVA ($F(9,99) > 0,05$) não havendo diferença significativa entre os grupos experimentais.

Número de Eventos	Grupos experimentais									
	G0	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M1C1	M2C2	M3C3
FE	135,4 ± 19,9	148,0 ± 21,1	141,2 ± 20,0	134,4 ± 17,1	138,3 ± 15,7	145,5 ± 9,9	144,7 ± 13,7	142,6 ± 10,9	139,1 ± 13,0	140,2 ± 13,8
FF	28,0 ± 12,3	34,6 ± 10,2	36,3 ± 12,6	32,7 ± 11,7	33,5 ± 10,6	32,7 ± 10,5	32,1 ± 10,7	35,7 ± 13,0	35,3 ± 8,0	42,0 ± 14,0
PR	19,5 ± 9,4	18,8 ± 6,0	16,4 ± 4,0	20,5 ± 8,5	18,4 ± 5,6	18,8 ± 7,0	19,1 ± 8,7	17,0 ± 6,1	17,1 ± 8,9	15,8 ± 5,6
CA	0,6 ± 1,6	0,5 ± 1,1	0,1 ± 0,3	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,6	0,3 ± 1,0	0,8 ± 1,1	0,6 ± 1,1	0,7 ± 1,1	0,2 ± 0,6
AF	2,5 ± 2,4	1,7 ± 1,6	2,5 ± 2,4	1,4 ± 1,6	2,2 ± 2,3	1,2 ± 1,3	1,7 ± 1,4	2,5 ± 2,8	1,8 ± 1,8	2,8 ± 2,4
PE	2,8 ± 3,1	1,2 ± 1,4	2,5 ± 2,2	1,3 ± 1,5	1,9 ± 1,7	1,6 ± 1,7	3,3 ± 3,0	1,6 ± 1,8	1,6 ± 1,7	2,8 ± 2,1
FU	5,1 ± 4,4	2,8 ± 1,9	5,7 ± 5,7	2,1 ± 1,9	4,3 ± 4,0	2,9 ± 2,5	4,3 ± 4,4	4,4 ± 4,0	3,2 ± 2,8	4,8 ± 4,2
NL	46,1 ± 13,1	42,9 ± 7,9	51,1 ± 14,3	46,7 ± 10,8	42,0 ± 9,7	37,3 ± 12,4	41,8 ± 10,7	38,2 ± 5,8	43,4 ± 9,2	41,8 ± 8,6
NR	9,4 ± 5,9	7,4 ± 4,4	6,4 ± 5,3	9,0 ± 4,7	7,6 ± 5,9	10,3 ± 4,8	8,9 ± 5,2	7,8 ± 3,3	6,5 ± 4,5	8,6 ± 6,4
NJ	1,6 ± 2,6	0,4 ± 1,3	0,2 ± 0,6	1,2 ± 1,7	1,0 ± 1,4	2,0 ± 2,7	2,0 ± 2,7	0,0 ± 0,0	1,6 ± 3,0	0,6 ± 1,4
SU	6,6 ± 5,9	5,8 ± 6,0	3,5 ± 3,1	4,1 ± 3,8	4,6 ± 4,5	1,7 ± 1,8	3,8 ± 4,0	5,8 ± 4,0	2,9 ± 1,7	4,0 ± 3,8
EM	9,2 ± 3,8	11,2 ± 5,0	7,5 ± 5,6	7,8 ± 3,1	8,2 ± 3,7	8,7 ± 6,7	7,3 ± 3,9	8,2 ± 4,2	7,9 ± 4,2	7,7 ± 4,7
PA	9,2 ± 3,3	11,2 ± 6,4	13,1 ± 8,7	10,1 ± 4,8	10,8 ± 4,5	13,0 ± 8,8	13,7 ± 9,3	11,6 ± 8,5	10,4 ± 6,3	9,2 ± 3,7

Tabela 6. Parâmetros zootécnicos: Ganho de Comprimento GC (cm), Ganho de Peso GP (g), Taxa de Crescimento Específico TCE (%), Taxa de Conversão Alimentar (TCA) e Sobrevivência S (%) de tilápia-do-Nilo expostos a níveis crescentes de emulsões durante 30 dias. Os grupos experimentais foram comparados pelo teste de Kruskal Wallis obtendo $p > 0,05$.

Parâmetros	Controle	M1	M2	M3	C1	C2	C3	M1C1	M2C2	M3C3
GC (cm)	1,7 ± 0,9	0,2 ± 0,6	1,4 ± 0,8	1,3 ± 0,6	1,5 ± 0,7	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,8	1,4 ± 0,5	1,3 ± 0,5	1,4 ± 0,7
GP (g)	0,5 ± 0,5	0,3 ± 0,3	0,4 ± 0,4	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,4 ± 0,4	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,26
TCE (%)	1,7 ± 1,5	0,9 ± 0,9	1,2 ± 1,3	1,0 ± 0,9	1,1 ± 0,8	1,1 ± 1,1	1,3 ± 1,4	1,0 ± 0,7	1,0 ± 0,8	1,9 ± 1,9
TCA	41,1 ± 43,9	93,0 ± 125,4	153,8 ± 328,5	56,4 ± 43	62,2 ± 70,1	66,4 ± 117	77,0 ± 91,0	84,3 ± 127,6	33,7 ± 18,5	39,8 ± 35,9
S (%)	75	80	75	80	80	85	90	80	75	75

Legenda: M = Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia*; C = Óleo Essencial de *Citrus aurantium*.

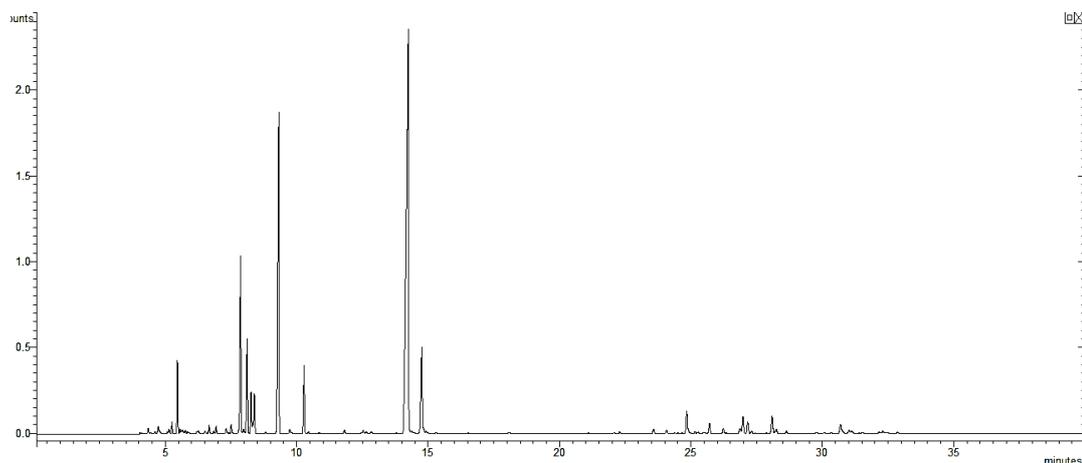
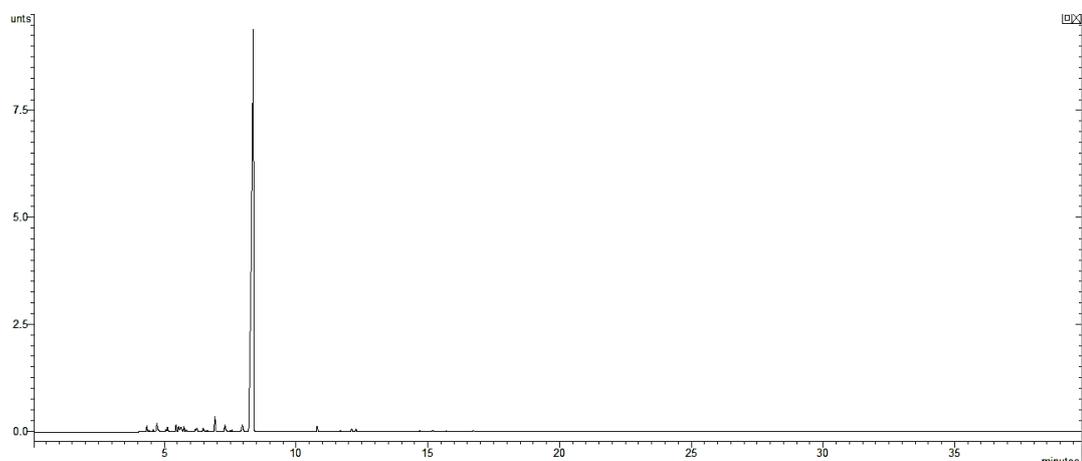


Figura 1. Cromatograma do óleo essencial das cascas de *Citrus aurantium* e *Melaleuca alternifolia*.

7. Considerações Finais

O presente trabalho descreve o processo de obtenção de um aditivo alimentar contendo nanoemulsão simples água/óleo essencial (A/OE) enriquecido com vitaminas C, D e E, e minerais Cálcio e Fósforo para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Com isso, conclui-se que:

- ✓ Nanoemulsões estáveis à base de óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Citrus aurantium* enriquecidos com vitaminas e sais minerais foram produzidas.
- ✓ A nanoemulsão foi caracterizada segundo a estabilidade, tamanho das partículas, características organolépticas e físico-químicas, e índice de polidispersão, indicando que M1 e C1 foram as melhores comparando às demais.
- ✓ Um aditivo alimentar contendo a nanoemulsão foi produzido com comprovada palatabilidade para a espécie *Oreochromis niloticus*, com 100% de consumo pelos animais.
- ✓ Parâmetros comportamentais não foram significativos, mostrando-se satisfatórios pois indicam que os OEs de M e C nas quantidades formuladas não interferiram nos eventos comportamentais.
- ✓ Os parâmetros zootécnicos foram pouco afetados nas condições estudadas destacando o aumento de sobrevivência nos grupos contendo a nanoemulsão.
- ✓ Foi possível depositar um pedido de patente do aditivo alimentar contendo nanoemulsão.

8. APÊNDICES – PRODUÇÕES

8.1 PATENTES

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ENRIQUECIDOS COM VITAMINAS E SAIS MINERAIS ADICIONADA À RAÇÃO PARA PEIXES, BR 10 2020 004277 7 - Data de depósito: 03/03/2020.

2. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM ADITIVO ALIMENTAR A BASE DE NANOEMULSÃO PARA A ENCAPSULAÇÃO DE TESTOSTERONA COM USO NA REVERSÃO SEXUAL DE PEIXES - BR 10 2020 004629 2 - Data de depósito: 06/03/2020.

3. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTENDO LEVODOPA ENCAPSULADA - BR 10 2020 024914 – Data de depósito: 07/12/2020.

8.2. Outras informações:

Participei em cursos de curta duração ofertados pela UFGD, ESCON, UFPE, Liga Acadêmica de Doenças Parasitárias e Zoonoses - UFMT, IFCE, Webinários ofertados pela UFG e UFAL, UFJ, e Workshops promovidos pela UFRPE.

8.3 Licença CEUA Nº 074/2019 - para realizar testes experimentais com os animais.

 UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE		CEUA - UFRPE Aprovado em <u>17/07/2019</u> Validade <u>17/07/2021</u>
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA H -05		
<p>Licença para o uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.</p>		
Número da licença	074/2019	
Número do processo	23082.015322/2019-12	
Data de emissão da licença	17 de julho de 2019	
Título do Projeto	Produção de ração contendo nanoemulsão a base de óleos essenciais enriquecidos com vitamina C, D, e E, cálcio e fósforo como aditivo * alimentar para Tilápia-do-Nilo (<i>Orochromis niloticus</i>)	
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão).	Pesquisa	
Responsável pela execução do projeto	Pabyton Gonçalves Cadena	
Colaboradores	Ester Inácio Damiano Quinova, Amanda Rodrigues dos Santos	
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Peixe macho 100, fêmea 100.Total: 200	