



**UFRPE**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

DESENVOLVIMENTO DE UMA NANOEMULSÃO COM TESTOSTERONA  
ENCAPSULADA E SEU USO PARA REVERSÃO SEXUAL DE TILÁPIAS  
(*Oreochromis niloticus*)

AMANDA RODRIGUES DOS SANTOS

RECIFE

2020

AMANDA RODRIGUES DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE UMA NANOEMULSÃO COM TESTOSTERONA  
ENCAPSULADA E SEU USO PARA REVERSÃO SEXUAL DE TILÁPIAS  
(*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

**Orientador:** Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena.

**Co-Orientadora:** Profa. Dra. Marília Ribeiro Sales Cadena

RECIFE

2020

AMANDA RODRIGUES DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE UMA NANOEMULSÃO COM TESTOSTERONA  
ENCAPSULADA E SEU USO PARA REVERSÃO SEXUAL DE TILÁPIAS  
(*Oreochromis niloticus*)

Área de Concentração: Biotecnologia

Data da Defesa:

Resultado: \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena – UFRPE (Orientador/Presidente)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

---

Prof. Dr. Tatiana Souza Porto – UFRPE (Titular)  
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco - UFAPE

---

Dr. José Manoel Wanderley Duarte Neto - UFRPE (Titular Externo)  
Instituto Agrônômico de Pernambuco: IPA

---

Prof. Dr. Pierre Castro Soares (Suplente)  
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

*Dedico essa dissertação a minha  
mãe, Ana Maria, a mulher que me deu  
a vida e minha maior incentivadora.*

*Obrigada por tudo!*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada sou. Por me dar forças para continuar em todos os momentos difíceis.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena, pela oportunidade, confiança e motivação. Tudo que sou e conquistei profissionalmente, devo a ele. Sou imensamente grata!*

*A minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Marília Ribeiro Sales Cadena, por toda confiança e apoio que me deu.*

*Ao Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá pela disponibilidade e ensinamentos em laboratório.*

*A minha mãe, Ana Maria, por todo o amor e apoio, me incentivando e acreditando em mim até quando nem eu mesma acreditava.*

*A todos os meus companheiros do LECA, em especial a Ester e Matheus que foram meus braços e pernas, me ajudando diretamente nos experimentos. Sou imensamente grata! Também deixo um agradecimento especial a Thamiris, Jadson, Ivanildo, Paulo e Renata que foram essenciais para que esta pesquisa fosse realizada.*

*As minhas “Kardashians” por todo amor e amizade desde a graduação, em especial a Vivianne, minha irmã científica, que sempre me apoiou, me ajudou e incentivou de todas as maneiras possíveis.*

*A todos os meus amigos por todo apoio e por me proporcionar momentos leves que me ajudaram a distrair a mente quando eu precisei, em especial a Letícia, minha melhor amiga, que mesmo longe, é e foi uma das principais incentivadoras do meu crescimento pessoal e profissional. Amo vocês!*

*A Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal pela oportunidade.*

*A CAPES, FACEPE e UFRPE pelo apoio financeiro.*

*A todos os membros que compõem a banca, que contribuíram com este trabalho.*

## RESUMO

A reversão sexual de tilápias é bastante utilizada na aquicultura para a obtenção de populações exclusivamente masculinas, principalmente utilizando hormônios andrógenos. Entretanto as técnicas utilizadas atualmente apresentam grande risco de contaminação para o produtor rural que manipula diretamente o hormônio, como também gera contaminação ambiental. A nanotecnologia vem como uma alternativa para contornar essa problemática, utilizando nanoemulsões para encapsular a testosterona. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um aditivo alimentar a base de uma nanoemulsão simples óleo em água (O/A) para encapsular testosterona a ser incorporado a ração comercial para peixes e sua aplicação na reversão sexual de tilápias. Foi realizada uma triagem de óleos e avaliação das características organolépticas e físico-químicas para determinar a melhor nanoemulsão. Foi realizado um teste de palatabilidade e para a reversão sexual foram utilizados 5 grupos experimentais, sendo eles o controle negativo, controle positivo e 30, 60 e 90 mg/kg (testosterona por quilo de ração). Foi possível produzir uma emulsão estável com tamanho nanométrico contendo a testosterona encapsulada e comprovar sua palatabilidade incorporada em uma ração para a tilápia. Foi constatado que a nanoemulsão é capaz de realizar a reversão sexual sendo a melhor concentração de 60 mg/kg a ser usada no aditivo. Com isso, conclui-se que foi possível desenvolver uma nanoemulsão com testosterona encapsulada como aditivo alimentar para rações de peixe capaz de realizar reversão sexual, proporcionando maior segurança ao produtor rural e **reduzindo o impacto ambiental**.

Palavras-chave: Tilapicultura, Peixe, Produção Animal, Reprodução, Testosterona.

## ABSTRACT

The sex reversal of tilapias is widely used in aquaculture to obtain exclusively male populations, mainly using androgen hormones. However, the techniques currently used represent a high risk of contamination for rural staff who directly manipulate this hormone. As well as, it produces environmental contamination. Nanotechnology comes as an alternative to overcome these limitations, using nanoemulsions to encapsulate testosterone. In this framework, the objective of this study was to develop a food additive based on a simple oil in water (O/W) nanoemulsion to encapsulate Testosterone to be incorporated into the commercial fish feed, and your application in the sex reversal of tilapias. An oil screening and evaluation of organoleptic and physicochemical properties were carried out to determine the best nanoemulsion. The palatability test was performed, and for sex reversal, 5 experimental groups were used, being the negative control, positive control and 30, 60 and 90 mg/kg (testosterone per kilo of feed). It was possible to produce a stable emulsion with nanometric size containing the encapsulated testosterone and to prove its palatability incorporated in a feed for tilapia. It was found that the nanoemulsion is capable of performing sex reversal, being the best concentration of 60 mg/kg to be used in the feed additive. Thus, it is concluded that it was possible to develop a nanoemulsion with testosterone encapsulated as a feed additive for fish food capable of performing sex reversal, providing greater safety to the rural staff and reducing the environmental impact.

Key words: Tilapicultura, Fish, Animal Production, Reproduction, Testosterone

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	8
2. Fundamentação Teórica	
2.1. Tilapicultura.....	10
2.2. A problemática da reversão sexual de tilápias.....	13
2.3. Sistemas de Liberação Controlada (SLC).....	14
2.4. Emulsões.....	16
2.5. Sistemas nanotecnológicos para reversão sexual de peixes.....	19
3. Objetivos.....	20
3.1. Geral.....	20
3.2. Específicos.....	20
4. Referências Bibliográficas.....	20
5. Capítulo I – Patente.....	26
6. Capítulo II – Artigo Reversão Sexual.....	49
7. Considerações Finais.....	71
8. Anexos: Produções.....	71

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de pescados mais consumidas mundialmente, destaca-se a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) com aproximadamente 4,2 milhões de toneladas produzidas apenas no ano de 2018 e esse número tem se mostrado crescente (FAO, 2019). Seu interesse comercial se dá principalmente pelo fato de que, nessa espécie, o macho possui uma taxa de crescimento maior que a fêmea, sendo mais vantajoso para o produtor produzir populações monossexo masculino, aumentando assim sua produtividade por área. Ainda, a presença de fêmeas nos tanques promove a reprodução descontrolada, o que gera grande heterogeneidade de tamanho, crescimento e peso dos animais, perdendo seu valor no mercado (FAO, 2019). Devido a estes fatores, somado ao seu alto valor comercial por kg e grande apreciação pela população que consome sua carne, técnicas de reversão sexual são aplicadas para a obtenção de populações 100% machos. A utilização de hormônios masculinos para este fim, promove um melhor controle reprodutivo de tilápias. Ainda que existam outros métodos, entretanto menos eficazes, grande parte dos países atualmente utiliza hormônios andrógenos para reversão sexual devido a sua alta taxa de sucesso entre 98 e 100% (ABO-AL-ELA, 2018). Essa indução é realizada geralmente utilizando a testosterona ou seus derivados administrada por via oral adicionada à ração. Nesse caso, níveis de até 2 mg/kg residuais são aceitos como seguros para o consumo humano (ZANARDI et al., 2011).

Entretanto, é comum que estes hormônios sejam manipulados por funcionários sem a devida capacitação, além de ter seu descarte inadequado. Isto ocorre principalmente pois não há uma disseminação nas propriedades rurais do conhecimento sobre os efeitos negativos que a exposição a testosterona pode causar. Estes procedimentos geram problemas aos funcionários que entram em contato direto com o hormônio, como também ao meio ambiente, devido ao descarte sem tratamento prévio. Ainda, estes efeitos se estendem a população que consome desta água, pois são despejados nos esgotos e chegam e grande parte chega aos corpos d'água e não são completamente eliminados após passar pelos tratamentos convencionais de água e esgoto (PONTELLI et al., 2016). No meio ambiente, estes hormônios se ligam aos receptores endócrinos dos organismos e são capazes de provocar

efeitos adversos na saúde, sendo denominados Disruptores Endócrinos (DEs) (GORE et al., 2015; WU et al., 2016). Dentre os efeitos negativos que a exposição direta a testosterona pode causar aos produtores rurais, encontram-se câncer de mama e testicular, infertilidade, alterações nos espermatozoides e endometriose (SIFAKIS et al., 2017). Na natureza, em animais aquáticos, podem provocar alterações comportamentais, gonadais e de desenvolvimento do sistema nervoso, masculinização de fêmeas, distúrbios de fertilidade e aumento da mortalidade (VOLKOVA et al., 2015).

Visando contornar esta problemática, é essencial a produção de medidas para redução destes impactos. Os Sistemas de Liberação Controlada (SLC) de fármacos podem ser utilizados para encapsulação hormônios. Devido ao seu mecanismo de ação, os SLCs permitem a redução da dose, consequentemente reduzindo também os possíveis efeitos colaterais e toxicidade, além de aumentar a estabilidade (BATISTA et al., 2014).

Nanoemulsões são SLCs consideradas um dos sistemas de carreamento com maior potencial de promover melhorias em substâncias bioativas, como sua biodisponibilidade e solubilidade (SALEM; EZZAT, 2018) e se mostram uma alternativa viável para a redução destes impactos. São sistemas que possuem maior capacidade de retenção, se mantendo assim por mais tempo no organismo, além de possuir estabilidade física longa devido ao tamanho nanométrico de suas partículas (SINGH et al., 2017). São comumente utilizadas em formulações orais, como por exemplo na indústria de alimentos como encapsulante de micronutrientes essenciais lipofílicos, utilizados em suplementos alimentares e ou ainda, utilizadas para disfarçar sabores ou aromas desagradáveis (ÖZTÜRK, 2017; SALEM; EZZAT, 2018). Por ser lipossolúvel, a testosterona pode ser facilmente incorporada à fase oleosa da nanoemulsão. Ainda, a nanoemulsão contendo o hormônio encapsulado protege este do sistema digestório e fatores ambientais, se mostrando uma boa alternativa para ingestão por via oral (GUPTA et al., 2016), tornando viável sua incorporação a ração para peixes.

Outras patentes utilizando SLCs para liberação de hormônios já foram depositados pelo nosso grupo de pesquisa, como por exemplo a produção de micropartículas de alginato de sódio para liberação controlada de hormônios

esteroides e antibióticos incorporados a aditivos alimentares para peixes (SANTOS et al., 2017) e a produção de uma nanoemulsão para liberação controlada de hormônios esteroides femininos como auxiliar em inseminações artificiais de tempo fixo de vacas (SANTOS et al., 2018).

Diante do exposto, torna-se necessária e viável a criação de uma nanoemulsão com testosterona encapsulada que poderá ser incorporada a ração comercial, visando um produto mais seguro e eficiente para a reversão sexual de tilápias, capaz de proporcionar maior segurança ao produtor e reduzir o impacto ambiental. Ainda, a utilização de um SLC a base de uma nanoemulsão torna-se possível baratear o processo de reversão, devido aos reagentes de custo reduzido e de fácil obtenção.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Tilapicultura

A aquicultura consiste na produção de organismos aquáticos e visa suprir a demanda da população em relação ao consumo de carne de pescados que aumenta em uma taxa média aproximada de 1,5% ao ano. Em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, essa procura é ainda mais comum. Apenas no ano de 2016 foram produzidos aproximadamente 171 milhões de toneladas, representando 47% do consumo de pescados mundial, se mostrando uma área de constante expansão (FAO, 2018).

Dentre várias atividades desenvolvidas pela aquicultura, na piscicultura, a tilápia-no-Nilo é a espécie que mais tem ganhado espaço, sendo a 4ª espécie mais produzida mundialmente, ficando atrás apenas das carpas. Muitas espécies de tilápia são produzidas, porém a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um dos peixes mais consumidos mundialmente com 4,2 milhões de toneladas produzidas apenas no ano de 2018 e esse número tem se mostrado crescente (FAO, 2018). Algumas qualidades foram determinantes para o interesse comercial na produção de tilápias, dentre os quais a grande resistência, fácil adaptação em variadas condições, alta produtividade, qualidade da carne e o rendimento em filé (FAO, 2019). Tilápias são animais com maturação sexual precoce e uma fêmea madura sexualmente pode produzir até 1500 ovos por

desova, sendo este número proporcional ao seu peso, portanto, fêmeas maiores tendem a produzir mais ovos. As fêmeas armazenam seus ovos fecundados dentro da boca para incubação e, após a completa absorção do saco vitelínico, os alevinos saem e a fêmea continua os armazenando eventualmente em sua boca quando existe perigo eminente FAO (2019).

Normalmente fêmeas em fase de incubação se isolam dos outros peixes, não se alimentam, abrem pouco a boca em movimentos respiratórios (FAO, 2018). Devido sua alta taxa de reprodução, os produtores conseguem rapidamente obter muitos animais com um baixo custo (GAMA, 2008). Entretanto, o controle reprodutivo torna-se um problema frente aos produtores, pois pode ocorrer superpopulação dos tanques, podendo acarretar competições por alimento e espaço, resultando em diferentes e baixas taxas de crescimento e perda de animais (MAINARDES-PINTO et al., 2000). Outro problema decorrente da superpopulação é a redução ou pausa completa das desovas, já que devido ao grande número de indivíduos, fisiologicamente é sinalizado para as fêmeas que não é necessário reproduzir (BHUJEL, 2000). Além disto, um número muito grande de animais altera as características físicas, químicas e biológicas da água (GAMA, 2008), além de não haver um controle da porcentagem de animais machos e fêmeas.

Nessa espécie, o macho possui uma taxa de crescimento maior que a fêmea e, além disto, a presença de fêmeas nos tanques promove a reprodução descontrolada, resultando em uma grande heterogeneidade no crescimento e peso dos animais, prejudicando a comercialização (FAO, 2019). Devido a isto, somado ao seu alto valor comercial por kg, técnicas de reversão sexual são aplicadas para a obtenção de populações 100% machos aumentando sua produtividade por área. Com esse propósito, primeiramente ocorre a retirada dos ovos das bocas das fêmeas entre os 2 ou 3 primeiros dias de vida para dar prosseguimento a reversão.

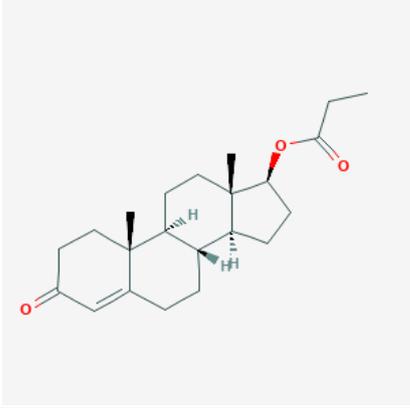
Algumas técnicas podem ser utilizadas para um melhor controle reprodutivo de tilápias com a obtenção de populações monossexo masculino, dentre os quais sexagem manual, hibridação interespecífica, produção de machos por alterações de temperatura e reversão sexual utilização hormônios andrógenos. A administração de hormônios geralmente ocorre durante a

esteroidogênese, período de desenvolvimento do alevino onde ocorre a diferenciação sexual, o que interrompe o processo natural e determina o sexo expressado (ABO-AL-ELA, 2018; ZANONI, et al., 2013)

Ainda que existam outros métodos, grande parte dos países optam pela reversão sexual por tratamento hormonal devido sua alta taxa de sucesso entre 98% e 100% de animais revertidos (ABO-AL-ELA, 2018). Hormônios esteroides sexuais hidrofóbicos como a testosterona e seus ésteres, podem ser utilizados para a produção de tilápias masculinizadas, como o testosterona, 19-noreiltestosterona, fluoximesterona, etiltestosterona e 17  $\alpha$ -metiltestosterona, dihidrotestosterona, androstenediona, acetato de trenbolona, mesterolona, 17  $\alpha$ -etiniltestosterona e 17  $\alpha$ -metildihidrotestosterona e Propionato de Testosterona.

O Propionato de Testosterona, andrógeno hidrofóbico utilizado neste projeto, é um anabólico amplamente utilizado para reposição hormonal na veterinária, encontrada comercialmente pelo nome Androgenol®, disponível em um veículo oleoso.

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas do Propionato de Testosterona (Fonte: PubChem 2020).

Nomenclatura IUPAC	[(8 R , 9 S , 10 R , 13 S , 14 S , 17 S ) - 10,13-dimetil-3-oxo-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15 , 16,17-dodeca-hidrociclopenta [a] fenantrena-17-il] propanoato
Fórmula estrutural	 The image shows the chemical structure of Testosterone Propionate. It features a steroid nucleus with a ketone group at C-3, a double bond between C-4 and C-5, and methyl groups at C-10 and C-13. At C-17, there is a propionate ester group (-O-C(=O)-CH2-CH2-CH3). Stereochemistry is indicated with wedges and dashes at C-8, C-9, C-10, C-13, and C-14.
Forma molecular	<u>C<sub>22</sub> H<sub>32</sub> O<sub>3</sub></u>
Peso Molecular	344,5 g / mol
Ponto de Fusão	118-123 ° C
Massa Exata	344,235145 g / mol

Meia vida biológica	4,5 dias
Solubilidade em água	4,30e-06 M

Quando o tratamento hormonal é aplicado, a testosterona, na maioria dos casos, é administrada por via oral, nesta situação, níveis de até 2 mg/kg residuais são aceitos como seguros para o consumo humano (ZANARDI et al., 2011). Por ser hidrofóbica, no Brasil, é comum a testosterona ser incorporada a ração após ser diluída em etanol e essa mistura fica descansando para a completa evaporação do álcool para ser administrada aos animais no dia seguinte, apresentando um problema quando não manuseada adequadamente, o que muitas vezes ocorre sem o uso do EPI adequado.

## 2.2 A problemática da reversão sexual de tilápias

A manipulação e descarte indevidos destes hormônios em propriedades rurais por funcionários sem capacitação ou o descarte sem tratamento prévio gera problemas aos próprios usuários e ambientais. Aos funcionários, a contaminação por manipulação indevida pode acarretar câncer de mama e testicular, além de infertilidade, alterações nos espermatozoides e endometriose (SIFAKIS et al., 2017).

Quando presente na natureza, a testosterona pode atuar como Disruptor Endócrino (DE). No ambiente, são encontradas diversas substâncias consideradas DEs por provocar alterações na função hormonal natural dos animais ou sua descendência. Estas substâncias podem ser de natureza sintética ou natural e se ligam aos receptores endócrinos, causando distúrbios na síntese, secreção e metabolismo, mesmo quando presentes em níveis muito baixos (GORE et al., 2015; ROIG et al., 2014, WU et al., 2016).

Atualmente, é possível encontrar DEs presentes nos solos, em produtos agropecuários e, liberados de maneira natural, pelas excretas de animais e em efluentes. Ainda, o efeito nocivo destes se estende também à população, pois

grande parte das substâncias chegam aos corpos d'água e não são completamente eliminados após passar pelos tratamentos convencionais de água e esgoto (PONTELLI et al., 2016).

A toxicidade dos hormônios como DEs vem sendo investigados e, dentre os efeitos já conhecidos, são capazes de reduzir a fertilidade e provocar anomalias, doenças crônicas e câncer (PONTELLI et al., 2016; ANDRADE 2012). Ainda, no ambiente essas substâncias não são encontradas de maneira isolada, o que pode potencializar seus efeitos (MORAIS, 2008).

Em animais aquáticos, a exposição a hormônios sexuais femininos livres ou complexados já foram associados a alterações no desenvolvimento larval, distúrbios na diferenciação sexual (MEIJIDE et al., 2016), alterações comportamentais, reversão sexual, redução de fertilidade (VOLKOVA et al., 2015), deformações de cauda e coluna (SILVA et al., 2019) e aumento da mortalidade. Já a testosterona é pouco apontada como DE, devido sua baixa toxicidade no ambiente aquático. Quando atuante, a testosterona foi associada a más formações de cauda e coluna, surgimento de edemas, desenvolvimento anormal da cabeça e atraso na eclosão, segundo Rivero-Wendt et al., (2016).

Em um estudo realizado com *D. rerio* por Costa (2018), a testosterona e finasterida livres e complexadas à ciclodextrina, provocaram alterações nos batimentos cardíacos dos embriões e larvas, além de afetar diretamente o comportamento dos animais adultos, aumentando a agressividade e diminuindo o deslocamento no corpo d'água.

Com isto, torna-se necessária a criação de uma alternativa que vise proporcionar maior segurança ao produtor e reduzir o impacto ambiental.

### 2.3. Sistemas de Liberação Controlada (SLC)

Em tratamentos convencionais, após a administração de uma substância no organismo, apenas uma pequena parcela consegue chegar ao local de ação, devido à grande metabolização e a excreção. Isto acontece, pois, pouco tempo após a administração, sua concentração no organismo aumenta, atinge o ápice e logo depois é reduzida. Dessa forma, cada substância ativa possui uma faixa de ação terapêutica, onde fora dela a substância se torna tóxica ou ineficiente

(BASTO et al., 2016). Com isto, é necessário um maior número de administrações, resultando em desperdício e mais efeitos colaterais.

Devido ao seu mecanismo de ação, os Sistemas de Liberação Controlada (SLCs) possuem a capacidade de armazenar a substância química, liberá-la de maneira gradativa e conduzi-la até o local específico de atuação. Com isso, permitem a redução da dose, conseqüentemente reduzindo também os possíveis efeitos colaterais e toxicidade, além de aumentar a estabilidade da substância (ASSIS et al., 2012; BATISTA et al., 2014). Com a utilização dos SLCs é possível manter a concentração do medicamento entre a faixa de ação terapêutica por um tempo prolongado, utilizando uma única administração ou proporcionando um maior intervalo entre as administrações (BASTO et al., 2016; SASIKUMAR, A.; KAMALASANAN, 2017).

SLCs precisam ser biocompatíveis, biodegradáveis e possuir aplicações na indústria farmacêutica (JANA et al., 2016). Atualmente existem pomadas, suplementos, analgésicos, anticoncepcionais, repositores hormonais e outros tipos de produtos que utilizam SLCs em sua composição. Os SLCs podem ser constituídos por sistemas muito pequenos, como as nanopartículas que podem ser divididas em: Nanoagregados, sistemas coloidais nanométricos de morfologias diversas onde o fármaco é disperso; Nanocápsulas, sistemas que abrigam o fármaco em seu núcleo oleoso ou aquoso, envolto por uma membrana polimérica; Nanoesferas, partículas esféricas com um interior gelificado onde o componente é retido em sua composição (PAQUES et al., 2014). Ainda, vesículas, presentes nas emulsões, microemulsões e nanoemulsões, podem atuar como SLC e se mostram como uma alternativa eficiente para encapsulação de hormônios.

#### **2.4. Emulsões**

Emulsões são sistemas coloidais resultantes da mistura de uma fase apolar, geralmente composta por hidrocarbonetos e uma fase polar, geralmente composta por água, estabilizadas com o auxílio de tensoativos (ALMEIDA, 2014).

As emulsões podem ter viscosidade variada e podem ser classificadas como simples ou múltiplas. Quando simples, podem ser denominadas óleo-em-água (O/A), onde a fase oleosa está dispersa na fase aquosa, ou água-em-óleo (A/O) onde a aquosa está dispersa na fase oleosa. Quando múltiplas, podem ser água-em-óleo-em-água (A1/O/A2) ou óleo-em-água-em-óleo (O1/A/O2) (BASTO et al., 2016).

Em geral, emulsões apresentam propriedades físico-químicas e estabilidade diretamente influenciadas pela qualidade e quantidade de seus componentes, bem como suas condições de preparo. Características como polaridade, tensão superficial e pH podem ser determinantes para a estabilidade de uma emulsão. A estabilidade pode ser diretamente influenciada pela sedimentação, floculação ou reagrupamento das vesículas dispersas (DALTIM, 2011).

De acordo com Daltin (2011), o tensoativo utilizado ou a combinação deles também é determinante para a estabilidade, pois devem ser compatíveis com os outros componentes. Necessitam ser utilizados, pois reduzem a tensão superficial da água, determinante para a estabilização com óleo. Podem ser aniônicos, catiônicos, não iônicos ou anfóteros. A maior parte dos tensoativos existentes e utilizados são aniônicos, ficando na frente apenas dos tensoativos não iônicos. Geralmente não são compatíveis com tensoativos catiônicos devido a neutralização de cargas. São comumente utilizados na indústria na composição de sabões e xampus. Já tensoativos catiônicos são minoria e tem suas características físico-químicas sofrem influência na presença de sais ou pH extremos. Além disto, apresentam grande toxicidade aos animais aquáticos. Tensoativos não iônicos, ou etoxilados, são amplamente utilizados na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética, e geralmente são compatíveis com outros tensoativos, além de não sofrerem muitas alterações físico-químicas na presença de sais da solução. Em contrapartida, a solubilidade tende a diminuir em temperaturas mais altas. Tensoativos anfóteros possuem cargas positiva e negativa. Ainda, assim como os não iônicos, são compatíveis com outros tensoativos. Entretanto, são os menos utilizados devido ao seu custo geralmente elevado.

O Tween 80 e Span 80 são exemplos de tensoativos não iônicos, e são comumente utilizados em combinação. Além disto, possuem Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) opostos, enquanto o Tween 80 possui EHL 15,0, o Span 80 possui EHL 4,3. O EHL é utilizado para calcular a quantidade e proporção mais adequados de surfactantes para a estabilização de uma emulsão. Quanto maior for o número, mais porções hidrofílicas o surfactante terá, portanto mais propício para estabilizar emulsões O/A, quanto para emulsões A/O ocorre o inverso (DALTIM, 2011).

Emulsões podem ser produzidas pelo método de emulsificação direta, que são produzidas espontaneamente por diferenças de frações volumétricas das fases oleosa e aquosa dependendo diretamente das características físico-químicas de seus compostos e geralmente não necessita de energia mecânica, ou por *wash-out*, que funciona por inversão de fases, onde uma fase, seja ela oleosa ou aquosa, é vertida na outra sob velocidade constante (MORAIS, 2008).

Emulsões podem ser classificadas de acordo com o tamanho médio de suas vesículas dispersas. Nanoemulsões são sistemas que possuem vesículas de até 300 nanômetros e não devem ser confundidas com as microemulsões que, apesar de também possuírem tamanho nanométrico, possuem características físico-químicas **distintas**. (ANTON; VANDAMME, 2011; McCLEMENTS, 2012; SILVA et al., 2015). Podem ser aplicadas em várias formulações, como por exemplo em espumas, cremes, líquidos ou sprays, possuem maior superfície de contato devido ao tamanho de suas vesículas, melhoram a disponibilidade de fármacos lipofílicos e geralmente não necessitam de muita energia para serem produzidas (JAISWAL et al., 2015). Nanoemulsões são termodinamicamente instáveis, mas devido ao seu pequeno tamanho de vesículas podem parecer transparentes, e resistir a ação da gravidade, evitando a sedimentação, proporcionando, maior estabilidade e possuem uma maior capacidade de retenção, se mantendo mais tempo no organismo (ANTON; VANDAMME, 2011; McCLEMENTS, 2012; SINGH et al., 2017). São consideradas um dos sistemas de transporte com maior potencial de promover melhorias em substâncias bioativas, como sua biodisponibilidade e solubilidade (SALEM; EZZAT, 2018). Ainda, já foram utilizadas para reversão

sexual de tilápias com o intuito de obtenção de populações masculinas (JOSHI et al., 2019).

Nanoemulsões se mostram como uma alternativa eficiente para encapsulação de hormônios. Ainda, a nanoemulsão contendo o hormônio encapsulado protege este do sistema digestório e fatores ambientais, se mostrando uma boa alternativa para ingestão por via oral (GUPTA et al., 2016), podendo assim este aditivo ser incorporado a ração para peixes.

Adicionalmente, é importante comprovar a palatabilidade da ração para os peixes. Nanoemulsões são sistemas de carregamento comumente utilizados na indústria alimentícia, e podem ser utilizadas, por exemplo, na encapsulação de micronutrientes essenciais lipofílicos utilizados em suplementos alimentares, de probióticos ou ainda, utilizadas para disfarçar sabores ou aromas desagradáveis (ÖZTÜRK, 2017; SALEM; EZZAT, 2018). Devido a testosterona ser de natureza lipofílica, pode ser facilmente incorporada a fase oleosa da nanoemulsão, com isso, torna-se possível empregar a técnica de reversão sexual utilizado o sistema incorporado a ração para peixes.

## *2.5 Sistemas nanotecnológicos para a reversão sexual de peixes*

A nanotecnologia vem ganhando espaço em diversos âmbitos de atuação, incluindo a aquicultura, principalmente no desenvolvimento de produtos biodegradáveis. Novas tecnologias são desenvolvidas diariamente, gerando registros de patentes de invenção de produto e/ou processo e é importante conhecê-las. Devido ao fato da patente se tratar de um direito protegido por lei, impede que terceiros explorem financeiramente a tecnologia sem a devida autorização de seu inventor. Na aquicultura, é possível encontrar técnicas patenteadas, como por exemplo na produção de peixes reprodutivamente estéreis (WONG E ZOHAR, 2015), ou ainda, aplicadas para a reversão sexual de peixes, incluindo eletronarcose (CARLI et al., 1997), mudanças de temperatura (YAJUAN et al., 2013), transcrição reversa (XIAOCHUN et al., 2013), ou ainda, por indução através do estresse (FURUKAWA et al., 2010). Nanossistemas podem ser utilizados na aquicultura para o encapsulamento de substâncias como hormônios esteroides e antibióticos (SANTOS et al., 2017).

Além disto, técnicas de emulsão e produtos emulsionados são utilizados na produção animal (SANTOS et al. 2018), no controle de pragas (DUARTE NETO et al 2019; FERNANDES et al., 2014), ou ainda, na produção de vacinas (BAKER, et al., 2009). O número de patentes utilizando nanoemulsões vem crescendo consideravelmente nos últimos anos, com 221 documentos depositados apenas no ano de 2018, de acordo com a figura 1 (LENS, 2019).

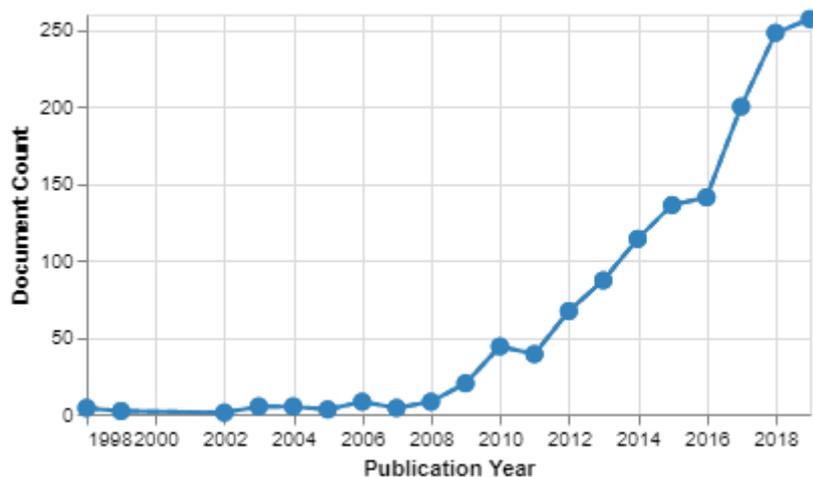


Figura 1. Distribuição temporal de depósitos de patente utilizando nanoemulsões (Lens, 2019).

Torna-se necessário conhecer as técnicas que utilizam nanoemulsões e as já aplicáveis para a reversão sexual de peixes, a fim de conhecer o mercado e aprimorar as técnicas desenvolvidas nesse estudo.

Diante do exposto, a produção de uma ração utilizando uma nanoemulsão para a liberação de testosterona, se mostra um método mais seguro e eficiente para a administração deste hormônio na aquicultura na reversão sexual de tilápias, já que o sistema permite a redução da dose necessária para a reversão sexual de peixes, diminuindo o impacto ambiental e proporcionando mais segurança ao produtor por se tratar de um produto final, não necessitando do contato do hormônio direto com a pele.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Produzir e caracterizar uma nanoemulsão óleo/água, contendo propionato de testosterona (PT) encapsulada, associada a uma ração para reverter sexualmente peixes das espécies *Oreochromis niloticus*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Realizar um monitoramento tecnológico sobre técnicas de reversão sexual de peixes;
- Produzir uma nanoemulsão óleo/água contendo testosterona encapsulada;
- Caracterizar as nanoemulsões desenvolvidas pelos seus parâmetros organolépticos e físico-químicos;
- Incorporar a nanoemulsão à uma ração para atuar como um produto veterinário para reversão sexual;
- Avaliar a eficiência da reversão sexual do produto veterinário na espécie *Oreochromis niloticus*;
- ~~Depositar um pedido de patente contendo o ativo alimentar a partir de uma nanoemulsão.~~

#### 4. Referências Bibliográficas

ABO-AL-ELA, H. G. Hormones and fish monosex farming: A spotlight on immunity, **Fish and Shellfish Immunology**, 72, 23-30, 2018.

ANDRADE, L. J. O. Interferon-alfa: Um disruptor endócrino? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 56(1), 72-73, 2012.

ANTON, N.; VANDAMME, T. E. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences, **Pharmaceutical Research**, 28: 978–985, 2011.

ASSIS, L. M. et al. Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos, **Brazilian Journal of Food Technology**, 15(2): 99-109, 2012.

ALMEIDA, J. K. P. et al. Caracterizações físico químicas de óleos vegetais utilizados para produção de biodiesel com metodologias alternativas simples. XXXI Encontro nacional de engenharia de produção. Abrejo. Belo Horizonte, MG, Brasil, 04 a 07 de outubro de 2011.

BATISTA, A. J. S.; PEPE, V. L. E. Os desafios da nanotecnologia para a vigilância sanitária de medicamentos, **Ciência & Saúde Coletiva**, 19(7), 2105-2114, 2014.

BAKER, et al., Nanoemulsion Influenza Vaccine, International Patent. WO 2009/131995, 29 out 2009, 132 p.

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

BHUJEL, R. C. A review of strategies for the management of Nile ž/tilapia *Oreochromis niloticus* broodfish in seed production systems, especially hap-based systems, **Aquaculture**, 181: 37–59, 2000.

CARLI, V. et al. Sistema de eletronarcose para uso na piscicultura, BR Pat. PI 9702848-7, 09 set 1997, 10 p.

COSTA, S. C. Efeitos tóxicos da finasterida e testosterona livre e complexadas a ciclodextrina na fisiologia e comportamento de *Danio rerio*, Dissertação, UFRPE, 54p., 2018

DALTIN, D. **Tensoativos**: química, propriedades e aplicações, São Paulo: Blucher, 2011, 325 p.

DUARTE NETO, J. M. Composição bioinseticida a base de endotoxina do *Bacillus thuringiensis* livre de esporos encapsulada via microemulsão água/óleo e seu processo de produção, BR Pat. BR 10 2019 014928 0, 19 jul 2019. 18 p.

FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Cultured Aquatic Species Information Programme *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Disponível em:

[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis\\_niloticus/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en). Acessado em: 10/10/2019.

FAO. 2018. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018** - Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FERNANDES, C. P. Nanoemulsão aquosa, processo de produção de nanoemulsão aquosa e método de controle de pragas. BR Pat. BR 102014004882 0, 28 fev. 2014. 15 p.

FURUKAWA, M. et al. Method for inducing masculinization of gonad of fishes by stress-induced stimulation, JP Pat. JP2011030562A, 18 jan 2010, 7 p.

GAMA, C. S. A criação de tilápia no estado do Amapá como fonte de risco Ambiental, **Acta Amazonica**, 38(3): 525-530, 2008.

GORE, A. C. et al. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. **Endocrine Review**. 36(6): E1–E150, 2015.

GUPTA, A. et al. Nanoemulsions: formation, properties, and applications, **Soft Matter**, 2(11): 2826-2841, 2016.

JANA, S. C. et al., *Drosophila melanogaster* as a model for basal body research, **Cilia**, 5(22): 7 p., 2016.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system, **3 Biotech**: 5:123–127, 2015.

LENS - Solving The Problem of Problem Solving, Disponível em: [www.lens.org](http://www.lens.org). Acessado em 23/07/2019.

MAINARDES-PINTO, C. S. R, et al. Masculinização da Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, Utilizando Diferentes Rações e Diferentes Doses de 17  $\alpha$ -Metiltestosterona, **Revista Brasileira de Zootecnia**, 29(3): 654-659, 2000.

McCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences and similarities, **Soft Matter**, 8:1719–1729, 2012.

MEIJIDE, F. J. et al., Effects of waterborne exposure to 17 $\beta$ -estradiol and 4-tert-octylphenol on early life stages of the South American cichlid fish

Cichlasomadimerus, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 124: 82–90, 2016.

MORAIS, J. M. Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas, A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino, Ribeirão Preto, 2008, 231p.

ÖZTÜRK, B. Nanoemulsions for food fortification with lipophilic vitamins: Production challenges, stability, and bioavailability, **European Journal of Lipid Science and Technology**, 119, 18p, 1500539, 2017.

PAQUES, J. P. et al. Preparation methods of alginate nanoparticles, **Advances in Colloid and Interface Science**, 209: 163–171, 2014.

PONTELLI, R. C. N. et al. Impacto na saúde humana de disruptores endócrinos presentes em corpos hídricos: existe associação com a obesidade? **Ciência & Saúde Coletiva**, 21(3): 753-766, 2016.

RIVERO-WENDT, C. L. G. et al. Steroid androgen 17 $\alpha$ -methyltestosterone induces malformations and biochemical alterations in zebrafish embryos, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 44: 107-113, 2016.

ROIG, B. et al. Endocrine Disrupting Chemicals and Human Health Risk Assessment: A Critical Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 43(21):2297-2351, 2014.

SASIKUMAR, A.; KAMALASANAM, K. Nanomedicine for prostate cancer using nanoemulsion: A review, **Journal of Controlled Release**, 260: 111-123, 2017.

SANTOS, A. R. et al. Processo de obtenção de micropartículas de alginato com aditivo alimentar para incorporação de fármacos para uso animal. BR Pat. BR 10 2017 014283 3, 30 jun. 2017. 10 p.

SANTOS, A. R. Processo de obtenção de um creme para uso veterinário a partir de uma nanoemulsão óleo/água (O/A) contendo hormônios esteroides, BR Pat. BR 10 2018 068629 1, 14 set. 2018, 10 p.

SALEM, M. A.; EZZAT, S. M. Nanoemulsions in Food Industry, **Some New Aspects of Colloidal Systems in Food**, Chapter 3: 31-51, 2018.

SIFAKIS, S.; ANDROUTSOPOULOS, V.P.; TSATSAKIS, A. M; SPANDIDOS, D.A. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 51: 56-70, 2017.

SILVA, J, D. F. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações, **Química Nova**, 38(9): 1196-1206, 2015.

SILVA, M. C. G. et al. The complexation of steroid hormones into cyclodextrin alters the toxic effects on the biological parameters of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, 214: 330-340, 2019.

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

VOLKOVA, K. et al. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol affects non-reproductive behavior and fertility as adults, and increases anxiety in unexposed progeny, **Hormones and Behavior**, 73: 30-38, 2015.

WONG, T.; ZOHAR, Y. Production of reproductively sterile fish: A mini-review of germ cell elimination technologies, **General and Comparative Endocrinology**, 221: 3-8, 2015.

WU, H. et al. Monitoring the contents of six steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in chicken, fish and aquaculture pond water samples using pre-column derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction with the aid of experimental design methodology. **Food Chemistry**, 192: 98-106, 2016.

XIAOCHUN, L. et al., Epinephelus coioides sex control gene Rspo1 and preparation method and application thereof, CN Pat. CN103724415B, 31 dez 2013, 15 p.

YAJUAN, L. et al. Method for inducing masculinization of fugu rubripes at low temperature. CN Pat. CN103210854B, 18 jan 2013, 7 p.

ZANARDI, M. F. et al. Concentrações de hormônio na carcaça de tilápias-do-Nilo e maturação precoce após reversão sexual, **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30(1): 7-11, 2011.

ZANONI, M. A. et al. Inversão sexual de alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade Supreme, submetidos a diferentes temperaturas durante fase de diferenciação sexual, **Semina: Ciências Agrárias**, 34(1): 455-466, 2013.

“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM ADITIVO ALIMENTAR A BASE DE  
NANOEMULSÃO PARA A ENCAPSULAÇÃO DE TESTOSTERONA COM USO NA  
REVERSÃO SEXUAL DE PEIXES”

### **Campo da invenção**

[001] O presente pedido de patente de invenção descreve um processo de obtenção de uma nanoemulsão óleo/água (O/A) produzida a partir de emulsificação sob agitação. A nanoemulsão serve como agente encapsulante para testosterona com o objetivo de incorporá-la a rações comerciais extrusadas, podendo ter aplicação na aquicultura, como por exemplo, obtendo a reversão sexual de peixes como tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). O presente pedido de patente de invenção se situa no campo da aquicultura com ênfase em bionanotecnologia aplicada a ciência animal.

### **Fundamentos da invenção**

[002] A aquicultura consiste na produção de organismos aquáticos e visa suprir a demanda da população em relação ao consumo de carne de pescados que aumenta em uma taxa média aproximada de 1,5% ao ano. Em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, essa procura é ainda mais comum. Apenas no ano de 2016 foram produzidos aproximadamente 171 milhões de toneladas, representando 47% do consumo de pescados mundial, se mostrando uma área de constante expansão (FAO, The State of World Fisheries and Aquaculture, 2018). Vale salientar que juntamente com todos os integrantes da América Latina e o Caribe, o Brasil participa de 14% da produção global e 23% da exportação mundial de produtos agrícolas e pesqueiros, e estima-se que até 2018 essa região seja responsável por um total de 25% da produção global de produtos agrícolas e pesqueiros (FAO, Cultured Aquatic Species Information Programme *Oreochromis niloticus*, 2019; OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development, 2019)

[003] Dentre várias atividades desenvolvidas pela aquicultura, a produção de tilápias tem aumentado, sendo a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) um dos peixes mais

consumidos em todo o mundo com aproximadamente 4,2 milhões de toneladas produzidas apenas no ano de 2018 (FAO, The State of World Fisheries and Aquaculture 2018). Tilápias são animais de grande resistência, fácil adaptação a variadas condições, alta produtividade, qualidade da carne, rendimento em filé e maturação sexual precoce, no qual uma fêmea madura pode produzir até 1500 ovos por desova (FAO, Cultured Aquatic Species Information Programme *Oreochromis niloticus*, 2019). Devido sua alta taxa de reprodução, os produtores conseguem rapidamente obter muitos animais com um custo baixo (GAMA, Acta Amazonica, 38(3): 525-530, 2008).

[004] Entretanto, o controle reprodutivo é um problema para os produtores de tilápia, pois pode ocorrer superpopulação dos tanques, podendo acarretar competição por alimento e espaço, resultando em redução na taxa de crescimento e perda de animais (MAINARDES-PINTO et al., Rev. Bras. Zootec., 29(3): 654-659, 2000). Outro problema decorrente da superpopulação é a redução ou pausa completa das desovas, já que devido ao grande número de indivíduos, fisiologicamente é sinalizado para as fêmeas que não é necessário reproduzir (BHUJEL, Aquaculture, 181: 37–59, 2000). Além disto, um número muito grande de animais pode alterar as características físico-químicas e biológicas da água (GAMA, Acta Amazonica, 38(3): 525-530, 2008) aumentando o estresse dos animais.

[005] Em indivíduos da espécie *O. niloticus*, o macho possui uma taxa de crescimento maior que a fêmea e, além disto, a presença de fêmeas nos tanques promove a reprodução descontrolada, resultando em uma grande heterogeneidade no crescimento e peso dos animais, prejudicando a comercialização (FAO, Cultured Aquatic Species Information Programme *Oreochromis niloticus*, 2019). Devido aos fatores relatados acima, somado ao alto valor comercial por quilograma dos machos, técnicas de reversão sexual são comumente aplicadas para a obtenção de populações exclusivamente de machos, aumentando a produtividade por área.

[006] As fêmeas armazenam seus ovos fecundados dentro da boca para incubação e, após a completa absorção do saco vitelínico, os alevinos saem e a fêmea continua armazenando eventualmente os alevinos em sua boca quando existe perigo eminente como estratégia de defesa (FAO, Cultured Aquatic Species Information Programme *Oreochromis niloticus*, 2019). Para a realização da técnica de reversão sexual,

primeiramente ocorre a retirada dos ovos das bocas das fêmeas entre os 2 ou 3 dias de vida para iniciar o procedimento.

[007] Após a coleta dos alevinos, algumas técnicas podem ser utilizadas para um melhor controle reprodutivo de tilápias com a obtenção de populações monossexo masculino, dentre os quais a sexagem manual, hibridação interespecífica, produção de machos por alterações de temperatura e reversão sexual utilizando hormônios andrógenos podem ser citadas. A administração de hormônios geralmente ocorre durante a esteroidogênese, período de desenvolvimento do alevino, com aproximadamente 7 a 15 dias de vida, onde ocorre a diferenciação sexual. Esta administração hormonal modifica o processo natural para a determinação do sexo do peixe (ABO-AL-ELA, *Fish and Shellfish Immun.*, 72: 23–30, 2018; ZANONI, et al., *Semina: Ciências Agrárias*, 34(1): 455-466, 2013).

[008] Ainda que existam outros métodos, é comum a opção pela reversão sexual por tratamento hormonal devido a sua alta taxa de sucesso, chegando a 98-100% de animais revertidos (ABO-AL-ELA, *Fish and Shellfish Immun.*, 72: 23–30, 2018). Quando o tratamento hormonal é aplicado, a testosterona, na maioria dos casos, é administrada por via oral e, nesta situação, níveis de até 2mg/kg residuais são aceitos como seguros (ZANARDI et al., *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(1): 7-11, 2011). Por ser hidrofóbica, no Brasil, é comum a testosterona ser incorporada à ração após ser diluída em etanol e essa mistura fica descansando para a completa evaporação do álcool para ser administrada aos animais no dia seguinte. Isto representa um problema quando não manuseada adequadamente, por exemplo, quando não se utiliza equipamentos de proteção individual como luvas (KLIPP; PEREIRA; JATOBÁ, *Revista Científica Rural*, 21(1), 205-216, 2019), pois pode levar a contaminação do usuário como o resíduo do hormônio.

[009] A manipulação indevida destes hormônios em propriedades rurais por funcionários sem capacitação ou o descarte sem tratamento prévio do material gera problemas ambientais. Aos funcionários envolvidos, a contaminação por manipulação indevida pode provocar câncer de mama e testicular, além de infertilidade, alterações nos espermatozoides e endometriose (SIFAKIS et al., *Environ. Toxicol. Phar.*, 51: 56-70, 2017).

[0010] Quando presente na natureza, a testosterona pode atuar como disruptor endócrino (DE). No ambiente, são encontradas diversas substâncias consideradas DEs por provocar alterações na função hormonal natural dos animais ou sua descendência. Estas substâncias podem ser de natureza sintética ou natural e se ligam aos receptores endócrinos, causando distúrbios na síntese, secreção e metabolismo, mesmo quando presentes em níveis muito baixos (GORE et al., *Endocr. Rev.* 36(6): E1–E150, 2015; ROIG et al., *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(21): 2297-2351, 2014; WU et al., *Food Chem.*, 192: 98-106, 2016).

[0011] A toxicidade dos hormônios como DEs vem sendo investigados e, dentre os efeitos já conhecidos, podemos citar a redução da fertilidade e provocar efeitos teratogênicos, doenças crônicas e câncer (PONTELLI; NUNES; OLIVEIRA, *Ciência & Saúde Coletiva*, 21(3):753-766, 2016; ANDRADE, *Arq. Bras. de Endocrinol. & Metab.*, 56(1), 72-73, 2012). Ainda, no ambiente essas substâncias não são encontradas de maneira isolada e, a combinação delas, pode potencializar seus efeitos tóxicos (MORAIS, Tese, Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas, A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino, 231p., 2008).

[0012] Em animais aquáticos, a exposição a hormônios sexuais femininos já foi associada a alterações no desenvolvimento larval, distúrbios na diferenciação sexual (MEIJIDE et al., *Ecotox. Environ. Safe.*, 124: 82–90, 2016), alterações comportamentais, reversão sexual, redução de fertilidade (VOLKOVA et al., *Horm. Behav.*, 73: 30-38, 2015), malformações (SILVA et al., *Chemosphere*, 214: 330-340, 2019) e aumento da mortalidade. Já a testosterona é pouco descrita como DE, devido sua baixa toxicidade no ambiente aquático comparado aos hormônios sexuais femininos. Quando atuante, a testosterona foi associada a malformações de cauda e coluna, surgimento de edemas, desenvolvimento anormal da cabeça e atraso na eclosão no peixe *Danio rerio* (Rivero-Wendt et al., *Environ. Toxicol. Phar.*, 44, 107-113, 2016).

[0013] Ainda, a exposição a testosterona e finasterida (outro andrógeno) livres e complexadas à ciclodextrina em embriões e larvas de *Danio rerio*, provocaram alterações nos batimentos cardíacos, além de afetar diretamente o comportamento dos animais adultos como aumento da agressividade e diminuindo o deslocamento no corpo d'água

(COSTA, Dissertação, Efeitos tóxicos da finasterida e testosterona livre e complexadas a ciclodextrina na fisiologia e comportamento de *Danio rerio*, UFRPE, 54p., 2018).

[0014] Com isto, torna-se necessária a criação de uma alternativa que vise proporcionar maior segurança ao produtor rural e reduzir o impacto ambiental deste hormônio comumente utilizado na reversão sexual de peixes.

[0015] A nanotecnologia conquistou grande espaço na indústria, tornando-se um extenso campo de pesquisa devido a seu grande potencial de inovação, permitindo novas aplicações em diversas áreas de atuação da humanidade. Na aquicultura, é principalmente utilizada no desenvolvimento de produtos biodegradáveis. A redução do tamanho de partículas está dentre as várias vantagens existentes no uso de sistemas nanotecnológicos. Podemos pontuar ainda, a redução da toxicidade e aumento da biodisponibilidade quando comparadas as formulações tradicionais (SILVA et al., Conference Paper, Nanotecnologia: Paradigma entre Benefícios e Riscos, 2012).

[0016] Dentre as vantagens dos sistemas nanotecnológicos, encontramos a liberação controlada, onde estes sistemas possuem a capacidade de armazenar uma substância química em seu interior e liberá-la de maneira prolongada. Ainda podemos citar os sistemas sítio específicos que são capazes de conduzir o princípio ativo até o local específico de atuação. Devido a isto, os sistemas nanotecnológicos permitem a redução da dose necessária para o tratamento, conseqüentemente reduzindo também os possíveis efeitos colaterais e toxicidade, além de aumentar a estabilidade da substância encapsulada (ASSIS et al., Braz. J. Food Technol., 15(2): 99-109, 2012; BATISTA et al., Ciência & Saúde Coletiva, 19(7), 2105-2114, 2014).

[0017] Em tratamentos convencionais, após a administração de uma substância no organismo, apenas uma pequena quantidade do princípio ativo consegue chegar ao local alvo, devido ao grande percentual deste princípio ativo ser metabolizado e excretado. Isto acontece, pois, pouco tempo após a administração, a concentração no organismo aumenta, atinge o ápice e logo depois é reduzida. Dessa forma, cada princípio ativo possui uma faixa de ação terapêutica, onde fora dela a substância se torna tóxica, pouco eficiente ou ineficiente (BASTO et al. Medicina Veterinária - UFRPE, 10(1-4): 25-33, 2016). Com isto, é necessário um maior número de administrações, resultando em

desperdício e mais efeitos colaterais. Os sistemas nanotecnológicos através da liberação controlada consegue reduzir os níveis tóxicos e subterapêuticos aumentando a eficiência dos produtos desenvolvidos.

[0018] Para serem utilizados na indústria, os sistemas nanotecnológicos precisam ser biocompatíveis, biodegradáveis e possuir aplicabilidade (JANA et al., *Cilia*, 5(22): 7 p., 2016). Atualmente é possível encontrar sistemas nanotecnológicos na composição de pomadas, suplementos, analgésicos, anticoncepcionais, repositores hormonais e outros tipos de produtos.

[0019] Emulsões e as nanoemulsões, podem ser considerados sistemas nanotecnológicos e se mostram uma alternativa eficiente para encapsulação de hormônios. São sistemas coloidais resultantes da mistura de uma fase apolar, geralmente composta por hidrocarbonetos e uma fase polar, geralmente composta por água, estabilizadas com o auxílio de tensoativos (ALMEIDA, Resumo, XXXI Abrejo, Belo Horizonte, 2011). Podem ter viscosidade variada e ser classificadas como simples (óleo em água, O/A, ou água em óleo, A/O) ou múltiplas (água em óleo em água, A1/O/A2, ou óleo-em-água-em-óleo, O1/A/O2) (BASTO et al. *Medicina Veterinária - UFRPE*, 10(1-4): 25-33, 2016).

[0020] Em geral, emulsões apresentam propriedades físico-químicas e estabilidade diretamente influenciadas pela qualidade e quantidade de seus componentes, bem como suas condições de preparo. O tensoativo utilizado ou a combinação deles é um dos fatores determinantes para a estabilidade, já que devem ser compatíveis com os outros componentes. Sua presença na composição de uma emulsão é de grande importância, já que reduzem a tensão superficial da água, determinante para a estabilização com óleo. Podem ser de natureza aniônica, catiônica, não iônica ou anfótera, entretanto, a maioria dos tensoativos existentes e utilizados são aniônicos, ficando na frente apenas dos tensoativos não iônicos. Tensoativos não iônicos, ou etoxilados, são amplamente utilizados na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética, já que geralmente são compatíveis com outros tensoativos e não sofrem tantas alterações físico-químicas na presença de sais na solução. Em contrapartida, sua solubilidade tende a diminuir em temperaturas elevadas (DALTIM, *Tensoativos*, Blucher, 325 p. 2011).

[0021] O Polissorbato 80 (Tween 80®) e Monooleato de Sorbitano (Span 80®) são exemplos de tensoativos não iônicos, e são comumente utilizados em combinação. Além disto, possuem Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) opostos, enquanto o Tween 80 possui EHL 15,0, o Span 80 possui EHL 4,3. O EHL é utilizado para calcular a quantidade e proporção mais adequados de surfactantes para a estabilização de uma emulsão. Quanto maior for o número, mais porções hidrofílicas o surfactante terá, portanto mais propício para estabilizar emulsões O/A. Já para emulsões A/O ocorre o inverso (DALVIN, Tensoativos, Blucher, 325 p. 2011).

[0022] Sistemas como as emulsões, podem ser classificadas de acordo com o tamanho médio de suas vesículas dispersas. Nanoemulsões possuem vesículas de até 300 nanômetros e não devem ser confundidas com as microemulsões que, apesar de também possuírem tamanho nanométrico, possuem características físico-químicas **distintas** (ANTON & VANDAMME, Pharm. Res., 28: 978– 985, 2011; McCLEMENTS, Soft Matter, 8:1719–1729, 2012; SILVA et al., Química Nova, 38(9): 1196-1206, 2015). Podem ser aplicadas em várias formulações, como por exemplo em espumas, cremes, líquidos ou sprays, possuem maior superfície de contato devido ao tamanho de suas vesículas, melhoram a disponibilidade de fármacos lipofílicos e geralmente não necessitam de muita energia para serem produzidas (JAISWAL et al., 3 Biotech: 5:123–127, 2015). Nanoemulsões são termodinamicamente instáveis, mas devido ao seu pequeno tamanho de vesículas podem parecer transparentes, e resistir a ação da gravidade, evitando a sedimentação, proporcionando, maior estabilidade e possuem uma maior capacidade de retenção, se mantendo mais tempo no organismo (ANTON & VANDAMME, Pharm. Res., 28: 978– 985, 2011; McCLEMENTS, Soft Matter, 8:1719–1729, 2012, 2012; SINGH et al., J. Control. Release, 252: 28-49, 2017). São consideradas um dos sistemas de liberação controlada com maior potencial de promover melhorias em moléculas bioativas, como sua biodisponibilidade e solubilidade, e podem ser utilizadas, por exemplo, na encapsulação de micronutrientes essenciais lipofílicos utilizados em suplementos alimentares, de probióticos ou ainda, utilizadas para disfarçar sabores ou aromas desagradáveis (ÖZTÜRK, Eur. J. Lipid Sci. Technol., 119, 1500539, 18p, 2017; SALEM & EZZAT, Some New Aspects of Colloidal Systems in Food, Cap. 3: 31-51, 2018).

[0023] Nanoemulsões se mostram como uma alternativa eficiente para encapsulação de hormônios. Além disso, a nanoemulsão protege o princípio ativo do sistema digestório e fatores ambientais, se mostrando uma boa alternativa para ingestão por via oral (GUPTA et al., *Soft Matter*, 2(11): 2826-2841, 2016), portanto este aditivo pode ser incorporado a rações comerciais para peixes sendo, neste caso, considerado um aditivo alimentar nanotecnológico.

[0024] Devido a testosterona ser de natureza lipofílica, pode ser facilmente incorporada a fase oleosa da nanoemulsão, com isso, torna-se possível empregar a técnica de reversão sexual utilizando um sistema nanotecnológico incorporado a ração para peixes.

[0025] Na aquicultura, é possível encontrar técnicas patenteadas, como por exemplo na produção de peixes reprodutivamente estéreis (WONG; ZOHAR, *Gen. Comp. Endocr.*, 221: 3-8, 2015), ou ainda, aplicadas para a reversão sexual de peixes, incluindo eletronarcose (PI 970284-7), mudanças de temperatura (CN 103210854B), transcrição reversa (CN 103724415B), ou ainda, por indução através do estresse (JP 2011030562A). Sistemas nanotecnológicos podem ser utilizados na aquicultura para o encapsulamento de substâncias como hormônios esteroides e antibióticos (BR 102017014283-3). Além disto, processos de produtos a base de emulsões são utilizados na produção animal (BR 102018068629-1), no controle de pragas (BR 102019014928-0; BR 102014004882-0), ou ainda, na produção de vacinas (WO 2009/131995). O número de patentes utilizando nanoemulsões vem crescendo consideravelmente nos últimos anos, com 221 documentos depositados apenas no ano de 2018 (LENS, *Solving The Problem of Problem Solving*, 2019) mostrando a aplicação industrial deste tipo de processo e produto com viabilidade na área animal.

[0026] Devido as vantagens das nanoemulsões em comparação as técnicas tradicionais e outros sistemas nanotecnológicos, torna-se necessário conhecer as técnicas já existentes e aplicáveis para a reversão sexual de peixes.

[0027] Diante do exposto, a utilização de uma nanoemulsão contendo testosterona encapsulada, se mostra um método mais seguro e eficiente para a administração deste hormônio incorporados em rações comerciais para uso na aquicultura, já que pode acarretar na redução da dose necessária para a reversão sexual de peixes, o que poderia

diminuir o impacto ambiental, além de poder ser seguro para o produtor por se tratar de um produto final, não necessitando do contato direto com o hormônio puro.

[0028] Na literatura, o documento CN 107197792 descreve um método para a reversão sexual de garoupas fêmeas para macho a partir da manipulação do tamanho total da população. O documento difere da presente invenção em sua composição por apresentar um método que induz de forma natural, sem a necessidade da utilização de alguma substância como a testosterona que facilite o processo.

[0029] Na literatura são encontrados métodos de reversão sexual de peixes utilizando hormônios andrógenos para a obtenção de populações monossexo masculino como os documentos WO 1997009966, CN 106172140 e CN 1377703. Entretanto, diferem da presente invenção por não se tratar de sistemas nanotecnológicos utilizados para a encapsulação destes hormônios andrógenos.

[0030] O documento CN 109924149 descreve a reversão sexual de *Epinephelus akaara* por meio da utilização de extratos de folhas, caule, raiz e sementes de *Morinda officinalis*. Difere da presente invenção em sua composição, já não utiliza testosterona ou um sistema nanotecnológico.

[0031] O documento CN 101002546 faz uso da combinação de técnica de indução por temperatura e exposição hormonal de metiltestosterona para a obtenção de populações monossexo masculinas de *Banhuashe soleidae*. As larvas são expostas a temperaturas de 28-32 °C ou metiltestosterona por 50-60 dias. Difere da presente invenção em sua composição, já que não utiliza um sistema nanotecnológico para encapsular a testosterona não sendo conspirado um aditivo alimentar.

[0032] O documento BR 10201402627-7 descreve a produção de complexos de inclusão com ciclodextrinas para incorporar 17- $\alpha$ -metiltestosterona utilizada na reversão sexual de peixes. O documento difere da presente invenção em sua composição, já que não usa nanoemulsão para encapsular a testosterona nem incorporação em rações comerciais como um aditivo nanotecnológico.

[0033] Adicionalmente, na literatura são encontrados documentos que tem a finalidade de obtenção de populações de peixes monossexo masculinas como os documentos CN

101305697, CN 101664006, CN 101664005 e CN 107232092 por meio de variações de temperatura e condições especiais de incubação, os documentos CN 101390503, CN 101225437, CN 1994072, CN 103724415, CN 102068429, CN 105360034, CN 1340298, AU 2018217825, US 2018317459, CN 101390503B, CN 107996468A, CN 106417256, CN 109837346 e CN 103798169 por métodos moleculares e manipulações genéticas, CN 207638639 por exposição de voltagem e o documento CN104285866 que utiliza um implante hormonal. Ainda, alguns documentos utilizam a combinação de um ou mais métodos. Todos os documentos citados acima, diferem da presente invenção por não utilizarem sistemas nanotecnológicos como aditivos alimentares para serem incorporados em rações comerciais.

[0034] Documentos como CN 106259089, CN 106399293, CN 106259089, CN 103548740 e CN 109769722 estão disponíveis na literatura para a reversão sexual de peixes para obtenção de populações predominantemente femininas, se diferenciando da presente invenção pelo propósito de obtenção, além de sua composição, pois não utilizam testosterona.

[0035] O documento CN 106417256A descreve um método caracterizado pela utilização de espermatozoides de milter para aumento da proporção de machos obtidos em população de peixe truta. Neste método o sêmen do peixe é coletado e armazenado em solução de preservação, para posteriormente ser utilizado no processo de reversão sexual. Desta forma, divergindo da presente invenção, da qual utiliza-se hormônios masculinos encapsulados em uma nanoemulsão e oferecidos aos animais adicionados a ração.

[0036] O documento US 2018317459 descreve um método para a produção de carpa comum super-macho YY e XY fisiologicamente fêmea. Este documento difere da presente invenção pois realiza técnicas de manipulação genética para a obtenção de uma população totalmente masculina e o método de reversão sexual é realizado com hormônios femininos e antagonistas do receptor de andrógeno.

[0037] O documento US 20050153301 descreve um método de reversão sexual de *Epinephelus coioides* (Garoupa-alaranjada) a partir da manipulação genética, onde é estimulado a produção de polipeptídios que posteriormente serão enriquecidos na

hipófise do animal estimulando assim, a diferenciação de gônadas e reversão sexual em organismos marinhos. O documento difere da presente invenção por não se caracterizar como um sistema nanotecnológico para a incorporação de testosterona.

[0038] O documento PI 9702848-7 descreve um sistema de eletronarcese para uso em piscicultura, onde se utiliza um dispositivo eletrônico com resistor e eletrodos capaz de lançar descargas elétricas na água onde ficarão condicionados os peixes, ainda é possível observar o estado de energização da água através de um LED tendo assim um controle do nível de energia liberada na água pelo resistor. O documento difere da presente invenção pela composição, processo e uso.

[0039] Nanoemulsões para encapsular hormônios estão descritos na literatura, como o documento BR 102018068629-1, que se trata de um creme vaginal para auxiliar na regulação do ciclo estral de vacas, que traz em sua composição óleo mineral, água e ésteres de progesterona e/ou estradiol. Este documento difere da presente invenção em sua composição, já que não foi desenvolvida para a encapsulação de testosterona e incorporação em rações comerciais para peixes.

[0040] O documento BR 102017014283-3 descreve um processo de obtenção de micropartículas de alginato contendo hormônios como a testosterona a serem utilizadas como aditivos alimentares para peixes. O documento difere da presente invenção em sua composição já que não é uma nanoemulsão e também no seu processo de produção.

[0041] O documento JP 2011030562A descreve um método para induzir a masculinização de peixes a partir da adição de substâncias como vitamina K, piperina, capsaicina e caroteno, à alimentação do peixe ou a água onde são criados, em uma certa concentração até que o sexo seja determinado a partir dos ovos. Isto induz a masculinização da gônada em alta velocidade, porém provoca estresse nos animais por estímulo aos canais potenciais de receptores transitórios na membrana plasmática, aumentando o cortisol. Este documento difere da presente invenção devido ao seu processo de produção e composição.

[0042] O documento CN 103798169A descreve um método para estabelecer rapidamente um sistema de melhoramento de reprodução de peixe super-macho YY. O método inclui triagem dos pais machos selvagens e a avaliação dos recursos de seu

germoplasma, estabelecimento da população reprodutiva básica feminina e masculina YY através do acasalamento e posterior reprodução, realização do teste de verificação de acasalamento. Os inventores relatam que de acordo com esse método, as diversidades genéticas do peixe super-masculino são aumentadas, a taxa de fertilização, a taxa de incubação e a taxa de sobrevivência são melhoradas. O documento difere da presente invenção por não se tratar de um processo nanotecnológico, como uma nanoemulsão e sua composição.

[0043] Ainda, artigos científicos envolvendo reversão sexual de tilápias utilizando testosterona para este fim estão disponíveis na literatura, como descrito no documento Joshi et al. (Aquaculture, 511: 1921-1925, 2019) que descreve um processo de produção de nanopartículas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) para a encapsulação de fadrozol. O sistema foi aplicado na reversão sexual de tilápias. O documento difere da presente invenção em seu processo e composição já que não contém produção de nanoemulsão com óleo vegetal para a encapsulação de testosterona. Já os documentos de Marjani et al. (J. Fish. Aquat. Sci. ,4(1): 71-74, 2009) e Ajiboye et al. (Fish Aquac J, 6(2): 7p, 2015), apesar de utilizarem a testosterona como indutor de reversão sexual de tilápias, utilizam a testosterona livre diluída em etanol e adicionada a ração, o que difere da presente invenção em seu processo e composição.

[0044] Diante do exposto, não foram encontradas informações no estado da técnica que divulguem os elementos contidos na presente invenção comprovando sua novidade. O estado da técnica também demonstra o espaço para a proposição de um novo produto para a reversão sexual de peixes, constituído por uma nanoemulsão que possui uma fase lipídica servindo a nanoemulsão como um agente encapsulante para a incorporação de testosterona.

### **Descrição da invenção**

[0045] Para fins desta invenção, o material lipídico utilizado na formulação foi um óleo vegetal, como óleos de canola, milho, girassol e algodão, mas preferencialmente óleo de soja, um líquido viscoso e não tóxico, utilizado comumente na alimentação humana e animal, que pode ser utilizado como fase oleosa da formulação de uma nanoemulsão para ser administrada incorporada a rações comerciais para peixes. Na formulação

descrita na presente invenção, o óleo vegetal serviu como fase orgânica onde a testosterona é adicionada na preparação da nanoemulsão.

[0046] Para fins desta invenção, parabeno foram utilizados como conservantes da nanoemulsão, preferencialmente, o propilparabeno, atuando como agentes responsáveis por prolongar a vida útil da formulação, evitando a proliferação de microrganismos. Ainda, o etanol foi utilizado como solubilizante para o propilparabeno. Outros álcoois também podem ser utilizados para a solubilização. A utilização do parabeno não é obrigatória para a formulação da emulsão. Outros agentes antimicrobianos também podem ser utilizados.

[0047] Para fins desta invenção, o propionato de testosterona foi utilizado como agente indutor da reversão sexual, podem ser utilizados diferentes concentrações como 2% a 6%, preferencialmente 2% na formulação da nanoemulsão. Outros hormônios esteroides sexuais andrógenos também podem ser utilizados para a produção de tilápias masculinizadas como a testosterona e seus ésteres, como a 19-noreilttestosterona, fluoximesterona, etilttestosterona, 17 $\alpha$ -metilttestosterona, di-hidrotestosterona, androstenediona, acetato de trembolona, mesterolona, 17  $\alpha$ -etinilttestosterona e 17  $\alpha$ -metildihidrotestosterona. A testosterona é o hormônio que promove a estimulação do desenvolvimento do sistema reprodutor masculino e das características secundárias masculinas (ABO-AL-ELA, Fish and Shellfish Immun., 72: 23–30, 2018).

[0048] A nanoemulsão foi preparada a partir das soluções: i. Fase aquosa composta de água compreendendo preferencialmente de 64% a 68% (p/p), e polissorbato 80 (tween 80) de 5 a 20% (p/p) submetida a suave agitação; ii. Álcool etílico contendo o conservante, preferencialmente propilparabeno (0,04 mg/mL). iii. Fase oleosa composta de óleo mineral, preferencialmente 10% (p/p), monooleato de sorbitano 80 (Span 80) de 5 a 20% (p/p) e uma solução comercial contendo 60 mg/mL de propionato de testosterona o que corresponde a 2% a 6%, preferencialmente 2%, submetida a suave agitação.

[0049] Para a preparação da nanoemulsão, as fases oleosa e aquosa foram preparadas separadamente. Primeiramente, a fase aquosa foi produzida sob agitação constante por pelo menos 5 minutos a partir água e polissorbato 80 (Tween 80®) nas concentrações de 5 a 20%, mas preferencialmente 10%. Esta fase foi homogeneizada sob agitação leve

e constante, preferencialmente 500 RPM. Após completa homogeneização, o álcool contendo o propilparabeno foi adicionado a fase aquosa ainda sob agitação, por pelo menos mais 5 minutos, permitindo a evaporação do álcool. Simultaneamente, a fase oleosa foi produzida sob agitação constante por pelo menos 5 minutos a partir de uma solução de óleo vegetal, preferencialmente de soja a 10%, e monooleato de sorbitano 80 nas concentrações de 5 a 20%, mas preferencialmente a 10%, até sua completa homogeneização. Esta fase foi homogeneizada sob agitação leve e constante, preferencialmente 500 RPM.

[0050] Em seguida, a fase oleosa foi vertida por gotejamento na fase aquosa e permaneceu sob agitação vigorosa e constante (preferencialmente, 1500 RPM), preferencialmente por 24 horas, para a formação da nanoemulsão óleo/água (O/A).

[0051] Por fim, a nanoemulsão foi incorporada a ração comercial extrusada macerada numa proporção preferencial de 10:1:1,5-4,5 (100 g de ração: 10 g de água: 1,5-4,5 g de emulsão) como teste para ser oferecida aos animais. Os resultados são descritos nos exemplos 4 e 5. Adicionalmente, a nanoemulsão também pode ser misturada a ração na forma de pós, após passar por técnicas, por exemplo, como liofilização ou spray drying sendo necessário a adição de agentes crioprotetores.

[0052] A nanoemulsão foi caracterizada e aplicada conforme descrito nos exemplos a seguir.

### **Exemplo 1: Produção da nanoemulsão em escala de bancada**

[0053] Para a determinação do melhor óleo vegetal e proporções de surfactantes para a formulação da nanoemulsão, foi realizada uma triagem com óleos 100% vegetais de algodão, canola, girassol, milho e soja, Tipo 1, conforme classificação na Instrução normativa Nº 49/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Normativa Nº49, 11 p., 2006). Os cinco óleos vegetais escolhidos são triglicerídeos que apresentam ácidos graxos poliinsaturados e de cadeia longa, o que aumenta a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos, como é o caso do propionato de testosterona. As nanoemulsões O/A foram preparadas a partir de uma fase oleosa (O) produzida de uma mistura de 10% (p/p) de óleo vegetal (Algodão, Canola, Girassol, Milho ou Soja), 5-15% (p/p) de Span® 80 e 6%

(p/p) (0,6 g em 10 g de emulsão) de uma solução de 60 mg/mL de propionato de testosterona. Esta concentração de testosterona é baseada na quantidade preconizada para o uso em ração comercial para a reversão sexual de peixes com concentração final de 60 mg/kg de ração (ZANARDI et al., R. Bras. Zootec., 30(1): 7-11, 2011). A fase O foi homogeneizada com o auxílio de um agitador magnético por 5 min a 500 RPM em temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C).

[0054] Em outro recipiente, a fase A foi preparada com 64% de água destilada (p/p) e 5-15% (p/p) de Tween® 80, esta fase foi homogeneizada por 5 min a 500 RPM. Após isto e ainda sob agitação, foi dissolvido 40 mg de propilparabeno em 1 mL de álcool etílico absoluto (0,4% p/p) para atuar como conservante e adicionado a fase aquosa ainda sob agitação, permanecendo por mais 5 minutos para completa evaporação do álcool. A presença de parabeno também foi fator de avaliação quanto à estabilidade da emulsão.

[0055] Em seguida, a fase O foi vertida na fase A por gotejamento (fluxo de 4 mL/min) ainda sob agitação para a formação da emulsão O/A. Por fim, a dispersão foi agitada a 1500 RPM por 24 h para obtenção do tamanho nanométrico. A composição das nanoemulsões submetidas a triagem foram avaliadas quanto as suas características organolépticas.

[0056] As características organolépticas das nanoemulsões foram avaliadas quanto ao seu aspecto visual, sendo classificadas pelos seguintes parâmetros: Fase da dispersão: Homogênea (HM) ou Heterogênea (HT); Aspecto – Consistência: Fluída (FL), Pouco Espessa (PE), Espessa (ES) ou Muito Espessa (ME); Aspecto – Opacidade: Translúcido (TR), Pouco Opaco (PO) ou Opaco (OP); Aspecto – Grumos: Presente (PR) ou Ausente (AU); Odor: Presente (PR) ou Ausente (AU); Cor: Presente (PR) ou Ausente (AU).

[0057] As nanoemulsões dos 5 óleos sendo Algodão - A, Canola - C, Girassol - G, Milho – M e Soja - S produzidas e identificadas a partir destas iniciais, acompanhado de números correspondentes a variação dos surfactantes e também a presença ou ausência de propilparabeno, sendo 1 – 5% Span, 15% Tween, Propilparabeno Presente; 2 – 10% Span, 10% Tween, Propilparabeno Presente; 3 – 15% Span, 5% Tween, Propilparabeno Presente; 4 - 5% Span, 15% Tween, Propilparabeno Ausente; 5 - 10% Span, 10% Tween, Propilparabeno Ausente; e 6 - 15% Span, 5% Tween, Propilparabeno

Ausente. Todas as formulações possuem 0,6 g de testosterona em 10 g de emulsão. Todas as formulações se mostraram homogêneas. Também foi observado que as formulações que possuíam em sua composição 5% p/p de Span® 80, com e sem propilparabeno, apresentaram consistência mais fluída (A1, A4, C1, C4, G1, G4, M1, M4, S1 e S4) em comparação com as demais. Ainda, à medida que essa concentração foi aumentada (10% e 15%), ficaram mais espessas apresentando consistências pouco espessa (A3 e A6), espessa (C6, G6, M6 e S6) ou muito espessa (C3, G3, M3 e S3). Em relação a opacidade, notou-se que as nanoemulsões contendo propilparabeno se mostraram opacas quando comparadas às nanoemulsões sem o conservante, com exceção da nanoemulsão S1 que se mostrou pouco opaca. Apenas a nanoemulsão S5 apresentou grumos. Todas as formulações não apresentaram odor ou cor.

[0058] As nanoemulsões sem propilparabeno se mostraram mais translúcidas e menos espessas em comparação com as nanoemulsões que continham o conservante. Entretanto, devido a nanoemulsão possuir óleos vegetais em sua composição e a mesma ser incorporada à ração para peixes, as nanoemulsões sem propilparabeno não foram utilizadas, ainda que com interferência na opacidade das formulações. As nanoemulsões contendo o conservante seguiu para os testes seguintes. Estas formulações sem parabeno podem ser utilizadas com outros métodos que protejam o aditivo nanotecnológico da degradação microbiana.

## **Exemplo 2: Avaliação da Estabilidade**

[0059] Para a avaliação da estabilidade, as nanoemulsões foram armazenadas em recipientes estéreis vedados contendo um *head space* equivalente a 1/3 do volume total do recipiente para permitir trocas gasosas.

[0060] Imediatamente após o preparo das formulações, as nanoemulsões foram submetidas a centrifugação a 1210 g por 30 minutos (Centrífuga Kacil CE-01) seguido de avaliação do Aspecto - Fase da dispersão: Homogênea (HM) ou Heterogênea (HT) Ainda, as nanoemulsões foram utilizadas para os testes de estresse térmico onde foram avaliados por 24 h de resfriamento ( $5 \pm 2$  °C), de congelamento ( $-20 \pm 2$  °C) e de aquecimento (37, 40 e  $50 \pm 2$  °C) onde as características organolépticas foram novamente observadas em comparação a formulação recém produzida. Foram

observados os seguintes parâmetros: Fase da dispersão: Homogênea (HM) ou Heterogênea (HT); Aspecto – Consistência: Fluída (FL), Pouco Espessa (PE), Espessa (ES) ou Muito Espessa (ME); Aspecto – Opacidade: Translúcido (TR), Pouco Opaco (PO) ou Opaco (OP); Aspecto – Grumos: Presente (PR) ou Ausente (AU); Odor: Presente (PR) ou Ausente (AU); Cor: Presente (PR) ou Ausente (AU). Após o teste, as nanoemulsões foram avaliadas a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) em relação a análise física macroscópica sendo comparados os resultados imediatamente após a preparação.

[0061] As nanoemulsões submetidas ao resfriamento ( $5 \pm 2$  °C) por 24 h não apresentaram alterações ao retornar a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), porém, quando submetidas ao congelamento ( $-20 \pm 2$  °C) por 24 h, a emulsão S1 se mostrou opaca após descongelamento em relação as demais.

[0062] As nanoemulsões submetidas ao aquecimento a  $37$  e  $40 \pm 2$  °C não apresentaram alterações, com exceção a emulsão S1, que após aquecida em temperaturas de  $37$ ,  $40$  e  $50$  °C se mostrou opaca quando comparada ao período anterior ao aquecimento (pouco opaca). Entretanto, a  $50 \pm 2$  °C, todas as emulsões com 15% p/p de Tween® 80 (A1, C1, G1, M1, S1), consideradas as mais fluídas, apresentaram separação de fases, sendo descartadas para os testes seguintes. As emulsões A2 e G2 também tiveram separação de fases a  $50$  °C sendo também descartadas. É preferível que a nanoemulsão seja mais fluída por ser mais fácil de ser produzida sob agitação magnética. Devido as nanoemulsões com 15% p/p de Span® 80 ficarem espessas, as formulações C2, M2 e S2 com 10% p/p de Span® 80 e 10% de Tween® foram preferidas às demais, seguindo para os testes seguintes.

### **Exemplo 3: Avaliação Físico-química**

[0063] Para a avaliação do tamanho médio das vesículas, índice de polidispersão e potencial zeta das nanoemulsões, amostras das nanoemulsões sem hormônio e com propionato de testosterona nas concentrações de 0,6; 0,4 e 0,2 g por 10 g de emulsão foram analisadas com o auxílio de um Zetasizer Nano ZS (Marvern). Estes valores foram testados devido ao excipiente oleoso presente na formulação comercial (propionato de testosterona), com o intuito de avaliar sua interferência nos valores observados. Para manter o volume total de acordo com a redução da testosterona, o volume

correspondente foi substituído por água em sua formulação. As nanoemulsões foram diluídas em água ultrapura para então serem submetidas a análise, reduzindo assim a turbidez sua mesma. Foram avaliados o tamanho médio (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (mV) das vesículas de óleo pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons padrão (PCS) fixado 90° a 25 °C utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) (CADENA et al., BBA, 1828:309-316, 2013; PEREIRA et al., Eur J Pharm Biopharm, 127: 51-60, 2019; RIQUELME et al., Food Sci, Technol., 111: 760-766, 2019). As análises foram realizadas em triplicata onde seus resultados são apresentados na Tabela 1.

[0064] Tabela 1. Avaliações de tamanho médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta ( $\zeta$  – mv) das nanoemulsões óleo em água (O/A) de óleo de Canola, Milho e Soja com propionato de testosterona (PT) e brancas (B).

Formulação Produzida	Tamanho Médio (nm)	PDI	$\zeta$ (mv)
B - Canola	54,26	0,398	-27,6
B – Milho	43,73	0,481	-35,7
B - Soja	163,9	0,395	-38,1
0,6 g de PT – Canola	162,4	0,508	-37,0
0,6 g de PT – Milho	139,9	0,472	-37,6
0,6 g de PT- Soja	212,4	0,408	-39,1
0,4 g de PT- Canola	154,7	0,305	-31,8
0,4 g de PT – Milho	131,1	0,396	-36,3
0,4 g de PT – Soja	136,6	0,276	-31,5
0,2 g de PT – Canola	90,63	0,316	-35,8
0,2 g de PT – Milho	75,97	0,348	-35,8
0,2 g de PT – Soja	74,43	0,35	-36,2

[0065] Conforme observado na Tabela 1, as emulsões produzidas são caracterizadas como nanoemulsões devido ao tamanho nanométrico de suas vesículas. As vesículas das formulações produzidas possuem tamanhos inferiores a 200 nm, com exceção da nanoemulsão de 0,6 g / 10 g de emulsão de propionato de testosterona e óleo de soja. Já em relação ao índice de polidispersão (PDI), referente a homogeneidade entre os tamanhos das vesículas, é preferível que os valores estejam abaixo de 0,7, preferencialmente, valores próximos a 0,3 indicam boa homogeneidade (CADDEO et al. Int. J. Pharm., 363(1-2), 183-191, 2008). Valores abaixo de 0,7 foram obtidos em todas as nanoemulsões e este valor foi reduzindo à medida que a quantidade de solução de propionato de testosterona também foi reduzida. Em relação ao potencial zeta ( $\zeta$  - mv), é preferível que os valores sejam o mais negativo ou positivo. A nanoemulsões produzidas apresentaram valores negativos indicando maior magnitude de interação das forças de repulsão entre as vesículas, garantindo sua estabilidade. Devido ao propionato de testosterona utilizado no laboratório ser dispersa em um veículo oleoso, foi observado que a presença deste veículo interferiu diretamente no tamanho das vesículas quando comparadas as formulações brancas. Entretanto, houve pouca variação em relação ao PDI e o potencial zeta. De acordo com os dados apresentados, a formulação que apresentou melhores parâmetros para uso comercial foi a nanoemulsão de óleo de soja contendo 0,2 g / 10 g de emulsão de propionato de testosterona de PT, correspondendo ao menor tamanho vesícula, menor PDI e maior potencial zeta.

#### **Exemplo 4: Teste de Palatabilidade**

[0066] O teste de palatabilidade foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais – CEUA (Licença 117/2019) da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A ração contendo o aditivo nanotecnológico foi preparada a partir de uma proporção 2:1:1 (ração:água:emulsão) sendo este material peletizado novamente para os juvenis de tilápia

[0067] A ração contendo as nanoemulsões (C2, M2 e S2) foram ofertada *ad libitum* a 30 indivíduos juvenis da espécie tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) com peso médio de 10,5 g. As rações foram ofertadas em dois dias consecutivos.

[0068] Houve 100% de ingestão das três rações ofertadas nos dois dias de experimentação constatando sua palatabilidade para os peixes. Dessa forma, o produto está pronto para ser oferecido aos animais para a realização do procedimento de reversão sexual.

**Exemplo 5: Aplicação da nanoemulsão como aditivo nanotecnológico para a reversão sexual de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

[0069] O teste de reversão sexual foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais – CEUA (Licença 117/2019) da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foi realizado um experimento utilizando 550 animais com aproximadamente 12 dias de vida (tamanho médio 10 mm) sendo divididos em 5 grupos experimentais. Os animais foram mantidos em condições controladas de laboratório e alimentados 6 vezes ao dia com os seguintes tratamentos: i. Controle Negativo – Ração macerada sem hormônio; ii. Controle Positivo – Ração macerada com 60 mg de propionato de testosterona em álcool (tratamento convencional); iii. Ração macerada contendo nanoemulsão para uma concentração final de 30 mg/kg de propionato de testosterona; iv. Ração macerada contendo nanoemulsão para uma concentração final de 60 mg/kg de propionato de testosterona; e v. Ração macerada contendo nanoemulsão para uma concentração final de 90 mg/kg de propionato de testosterona.

[0070] Ao término da experimentação, os animais foram eutanasiados e 20 animais por grupo foram escolhidos aleatoriamente e tiveram suas gônadas extraídas para posterior avaliação histológica para identificação do sexo.

[0071] Após a experimentação foi possível observar que, no controle negativo, houve uma incidência de 100% de ovotestis, sendo 30% correspondente a ovotestis com porções equivalentes de células gonadais femininas e masculinas, 10% correspondente a ovotestis com células predominantemente masculinas e 60% de ovotestis com células predominantemente femininas.

[0072] Já o grupo controle positivo, foi observado uma incidência de 60% de reversão (indivíduos machos) e 40% de ovotestis, sendo 30% correspondente a gônadas com células predominantemente masculinas e apenas 10% com células predominantemente femininas.

[0073] Foi possível observar que no grupo tratado com 30 mg/Kg de propionato de testosterona houve 35% de reversão (indivíduos machos), 10% ovotestis com células gonadais predominantemente masculinas, 40% de ovotestis com proporções semelhantes de ovogônias e espermatogônias e 15% correspondiam a ovotestis de células gonadais predominantemente femininas.

[0074] Já no grupo tratado com 60 mg/Kg de propionato de testosterona, foi obtida a taxa de reversão de 50% (indivíduos machos), 20% de ovotestis com células gonadais predominantemente masculinas, 20% de ovotestis com predominância feminina e 10% de células gonadais masculinas e femininas com proporções semelhantes.

[0075] No grupo tratado com 90 mg/kg de propionato de testosterona foi obtida uma taxa de 45% de reversão (indivíduos machos) e apenas 10% de ovotestis com células gonadais predominantemente masculinas. Os 45% restantes, correspondiam a 10% de ovotestis de predominância feminina e 35% de ovotestis com proporções semelhantes.

[0076] Com isso, é possível concluir que a nanoemulsão é capaz de fazer a reversão sexual nas concentrações estudadas.

## REIVINDICAÇÕES

1. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM ADITIVO ALIMENTAR A BASE DE NANOEMULSÃO PARA A ENCAPSULAÇÃO DE TESTOSTERONA COM USO NA REVERSÃO SEXUAL DE PEIXES” **caracterizado por** uma nanoemulsão óleo em água (O/A) com vesículas de tamanho inferior a 300 nm possuindo uma fase oleosa composta por óleos vegetais, monooleato de sorbitano 80 e hormônio andrógeno vertida sob uma fase aquosa composta por água, polissorbato 80 e um álcool contendo um conservante compreendendo o grupo dos parabenos sendo a dita nanoemulsão incorporada em rações comerciais para a reversão sexual de peixes.
2. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM ADITIVO ALIMENTAR A BASE DE NANOEMULSÃO PARA A ENCAPSULAÇÃO DE TESTOSTERONA COM USO NA REVERSÃO SEXUAL DE PEIXES”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** fase oleosa compreender óleos vegetais como os óleos de algodão, canola, girassol, milho ou soja.
3. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM ADITIVO ALIMENTAR A BASE DE NANOEMULSÃO PARA A ENCAPSULAÇÃO DE TESTOSTERONA COM USO NA REVERSÃO SEXUAL DE PEIXES”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** hormônio andrógeno utilizado ser a testosterona e seus derivados como os descritos no relatório descritivo.
4. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM ADITIVO ALIMENTAR A BASE DE NANOEMULSÃO PARA A ENCAPSULAÇÃO DE TESTOSTERONA COM USO NA REVERSÃO SEXUAL DE PEIXES”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** nanoemulsão ser incorporada em rações comerciais extrusadas para a reversão sexual de peixes como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

## RESUMO

### “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM ADITIVO ALIMENTAR A BASE DE NANOEMULSÃO PARA A ENCAPSULAÇÃO DE TESTOSTERONA COM USO NA REVERSÃO SEXUAL DE PEIXES”

A presente invenção descreve o processo de obtenção de uma nanoemulsão O/A com vesículas de tamanho inferior a 300 nm a partir de emulsificação sob agitação para a encapsulação de testosterona. Esta nanoemulsão é incorporada como um aditivo alimentar em rações comerciais extrusadas para peixes com o intuito de fazer reversão sexual. Este produto pode ser utilizado na aquicultura, atuando como indutor hormonal para a obtenção de populações monossexo masculino testado o qual foi testado na presente invenção. A incorporação da nanoemulsão em rações comerciais como um aditivo alimentar visa reduzir a contaminação do produtor rural pelo hormônio, visto que o mesmo está inserido dentro da ração, evitando o contato direto. Ainda, visa reduzir o impacto ambiental.

1 **Nanoemulsão contendo testosterona encapsulada para a produção de tilápia-do-**  
2 **Nilo (*Oreochromis niloticus*) masculinizada**

3

4 [Nanoemulsion with testosterona encapsulated for **production of masculinized Nile**  
5 **Tilapia (*Oreochromis niloticus*)** 

6

7 **Resumo**

8 O objetivo deste trabalho foi desenvolver um aditivo alimentar a base de uma  
9 nanoemulsão simples óleo em água (O/A) para encapsular testosterona a ser incorporado  
10 a ração comercial para peixes. Foi realizada uma triagem de óleos e avaliação das  
11 características organolépticas e físico-químicas para determinar a melhor nanoemulsão  
12 seguido de aplicação prática do produto na reversão sexual de tilápias. Foi possível  
13 produzir uma nanoemulsão estável com testosterona encapsulada e comprovar sua  
14 palatabilidade para a espécie. Foi observado uma grande incidência de gônadas contendo  
15 ovogônias e espermatogônias simultaneamente, principalmente no grupo controle  
16 positivo. Ainda, foi obtida a taxa de 60% de reversão neste grupo. Foi possível comprovar  
17 a eficiência da nanoemulsão como indutor de reversão sexual, obtendo taxas de 35, 50 e  
18 45% de eficiência nos grupos de 30, 60 e 90 mg/kg respectivamente. Diante dos  
19 resultados, podemos concluir que a nanoemulsão é capaz de induzir a reversão sexual em  
20 tilápias sendo possível sua aplicação como **um** produto comercial.

21 Palavras-chave: Reversão sexual, piscicultura, nanotecnologia, andrógenos.

22

23 **Abstract**

24 The objective of this work was to develop a food additive based on a simple oil in water  
25 (O/W) nanoemulsion to encapsulate testosterone to be incorporated into commercial fish  
26 feed. An oil screening and evaluation of the organoleptic and physical-chemical  
27 characteristics was carried out to determine the best nanoemulsion followed by the  
28 practical application of the product in the sex reversal of tilapia. It was possible to produce  
29 a stable nanoemulsion with encapsulated testosterone and prove its palatability for the  
30 species. A large incidence of gonads containing oogonia and spermatogonia was observed  
31 simultaneously, mainly in the positive control group. More, the rate of 60% of reversion  
32 was obtained in this group. It was possible to prove the efficiency of the nanoemulsion as

33 an inducer of sexual reversion, obtaining rates of 35, 50 and 45% efficiency in the groups  
34 of 30, 60 and 90 mg/kg respectively. In view of the results, we can conclude that the  
35 nanoemulsion is capable of inducing sexual reversion in tilapia, being possible its  
36 application as a commercial product.

37 Keywords: Sex reversal, fish farming, nanotechnology, androgens.

## 38 **1. Introdução**

39 Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e  
40 Alimentação, 2019) foram produzidos no mundo mais de 4,2 milhões de toneladas de  
41 tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) no último ano, sendo o Brasil um dos 10 maiores  
42 produtores. São animais que possuem carne bem apreciada, desovam durante todo o ano  
43 e o seu valor comercial por quilo é alto. Em tilápias, o macho tem uma taxa de crescimento  
44 maior que a fêmea, se tornando viável a produção de populações totalmente masculinas  
45 o que aumenta a produtividade por área. Para este fim, a reversão sexual é realizada,  
46 geralmente utilizando a exposição a hormônios andrógenos, como a testosterona e seus  
47 ésteres como 19-noreiltestosterona, fluoximesterona, etiltestosterona, 17 $\alpha$ -  
48 metiltestosterona, di-hidrotestosterona, androstenediona, acetato de trenbolona,  
49 mesterolona, 17  $\alpha$ -etiniltestosterona e 17  $\alpha$ -metildihidrotestosterona (Abo-Al-Ela, 2018;  
50 Mörschbacher et al., 2014; Zanoni et al., 2013). Quando os hormônios são utilizados na  
51 reversão, são aceitos níveis de até 2 mg/kg residuais, considerado seguro para o consumo  
52 humano (Zanardi et al., 2011).

53 Devido à utilização destes hormônios no processo de reversão sexual, é comum  
54 que os funcionários se contaminem durante a manipulação já que a testosterona é  
55 adquirida pura e diluída em etanol para ser adicionada a ração. Esta contaminação pode  
56 provocar câncer de mama e testicular, além de infertilidade, alterações nos  
57 espermatozoides e endometriose (Sifakis et al., 2017). Ainda, o descarte destes hormônios  
58 sem um tratamento prévio chega ao ambiente ocasionando problemas ambientais (Gore  
59 et al., 2015; Wu et al., 2016). Em animais aquáticos na natureza, essas substâncias podem  
60 ocasionar alterações comportamentais e principalmente, a masculinização de fêmeas e  
61 alterações na fertilidade afetando toda a cadeia alimentar (Volkova et al., 2015). Visando  
62 a redução de tais impactos, é possível utilizar da nanotecnologia para encapsular estes  
63 hormônios, protegendo-o de degradação e impedindo o contato direto com o produtor  
64 rural. Há uma grande variedade de sistemas nanotecnológicos com aplicabilidade na

65 aquicultura e as nanoemulsões se mostram uma alternativa eficiente para este fim. São  
66 sistemas coloidais resultantes da mistura de duas fases imiscíveis, geralmente composta  
67 de uma fase aquosa e outra oleosa (emulsões simples água em óleo – A/O ou óleo em  
68 água – O/A), estabilizadas com o auxílio de um tensoativo (Almeida, 2011). São sistemas  
69 nanotecnológicos sofisticados, termodinamicamente instáveis, mas com maior  
70 estabilidade já que devido ao tamanho nanométrico de suas vesículas, são capazes reduzir  
71 a sedimentação e permanecerem mais tempo no organismo (Anton; Vandamme, 2011;  
72 McClements, 2012; Singh et al., 2017). Seu tamanho nanométrico aumenta a superfície  
73 de contato e aumentam a biodisponibilidade e solubilidade de fármacos lipofílicos, sendo  
74 considerados um dos sistemas de carregamento capazes de promover melhorias em  
75 substâncias bioativas (Jaiswal et al., 2015; Öztürk, 2017; Salem; Ezzat, 2018).  
76 Nanoemulsões são sistemas biocompatíveis capazes de abrigar o princípio ativo e liberá-  
77 lo de maneira controlada, atuando como um sistema de liberação controlada (SLC). SLCs  
78 são amplamente utilizadas na indústria para encapsular fármacos e outras substâncias  
79 químicas. Sua característica de liberação permite a redução da dose, consequentemente  
80 reduzindo os efeitos colaterais e toxicidade (Batista et al., 2014).

81 Diante disto, o hormônio andrógeno pode ser incorporado na fase oleosa de uma  
82 nanoemulsão, por ser lipossolúvel. Observando estas vantagens, se mostram uma  
83 alternativa viável para a produção de um produto de uso veterinário para reversão sexual  
84 de peixes. A produção de uma nanoemulsão para a liberação de testosterona pode ser  
85 incorporada a rações comerciais. Há um interesse industrial na produção de novas  
86 tecnologias. É possível localizar produtos e processos patenteados para a obtenção de  
87 população de peixes masculinos. Trata-se de um método mais seguro e eficiente para a  
88 administração deste hormônio na aquicultura, já que o sistema permite a redução da  
89 contaminação e do impacto ambiental, proporcionando maior segurança ao produtor por  
90 se tratar de um produto final, não necessitando do contato direto com o hormônio. Diante  
91 disto o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracteriza uma nanoemulsão contendo  
92 testosterona encapsulada e sua incorporação em uma ração comercial aplicada a reversão  
93 sexual de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

## 94 **2. Material e Métodos**

### 95 *2.1. Material*

96 Foram utilizados o polissorbato 80 (Tween® 80, EHL = 15,0, Dinâmica, Brasil),  
97 monooleato de sorbitano 80 (Span® 80, EHL = 4,3, SIGMA, St Luiz, MO), propionato  
98 de testosterona (Androgenol®, Ceva Hertape, MG, Brasil), nipazol (propilparabeno,  
99 Dinâmica, Brasil), Etanol Absoluto (Dinâmica, Brasil). Todos os outros reagentes  
100 utilizados neste experimento foram de grau analítico. Foram selecionados cinco óleos  
101 vegetais para a realização de uma triagem. Os óleos utilizados eram 100% vegetais de  
102 algodão, canola, girassol, milho e soja (tipo 1), conforme classificação na Instrução  
103 normativa N° 49/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa,  
104 2006).

## 105 2.2. *Preparação das nanoemulsões*

106 Nesta primeira triagem foram avaliados o tipo de óleo vegetal, proporção de  
107 surfactantes e presença ou ausência de propilparabeno. As nanoemulsões preparadas  
108 foram identificadas a partir das iniciais de cada óleo, sendo Algodão - A, Canola - C,  
109 Girassol - G, Milho - M e Soja - S, acompanhado de números correspondentes a variação  
110 dos surfactantes e também a presença ou ausência de propilparabeno, sendo 1 - 5% Span,  
111 15% Tween, Propilparabeno Presente; 2 - 10% Span, 10% Tween, Propilparabeno  
112 Presente; 3 - 15% Span, 5% Tween, Propilparabeno Presente; 4 - 5% Span, 15% Tween,  
113 Propilparabeno Ausente; 5 - 10% Span, 10% Tween, Propilparabeno Ausente; e 6 - 15%  
114 Span, 5% Tween, Propilparabeno Ausente.

115 As nanoemulsões óleo/água (O/A) foram preparadas a partir de uma fase oleosa  
116 (O) produzida a partir de uma mistura de 10% (p/p) de óleo vegetal (Algodão, Canola,  
117 Girassol, Milho ou Soja), 5-15% (p/p) de Span® 80 e 6% (p/p) de solução de 60 mg/mL  
118 de Propionato de Testosterona (PT). Esta concentração de PT é baseada na quantidade  
119 preconizada para o uso por kilo de ração para a reversão sexual (Zanardi et al., 2011).

120 Para sua preparação, primeiramente a fase O foi homogeneizada com o auxílio de  
121 um agitador magnético por 5 min a 500 RPM em temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C).  
122 Simultaneamente em outro recipiente, a fase A foi preparada com 64% de água destilada  
123 (p/p) e 5-15% (p/p) de Tween® 80, esta fase foi homogeneizada por 5 min a 500 RPM.  
124 Após isto e ainda sob agitação, foi dissolvido 40 mg de propilparabeno em 1 mL de álcool  
125 etílico absoluto (0,4% p/p) para atuar como conservante e adicionado a fase aquosa,  
126 permanecendo por mais 5 min sob agitação para total evaporação do álcool. Em seguida,  
127 a fase O foi vertida na fase A por gotejamento (fluxo de 4 mL/min) sob agitação para a

128 formação da nanoemulsão O/A. Por fim, a dispersão foi agitada a 1500 RPM por 24 h  
129 para obtenção do tamanho nanométrico.

### 130 2.3. Caracterização das nanoemulsões

#### 131 2.3.1. Análise física macroscópica

132 Após 24 horas de agitação constante, as formulações foram avaliadas quanto as  
133 suas características organolépticas imediatamente após a preparação, quanto ao Aspecto  
134 - Fase da dispersão: Homogênea (HM) ou Heterogênea (HT); Aspecto – Consistência:  
135 Fluída (FL), Pouco Espessa (PE), Espessa (ES) ou Muito Espessa (ME); Aspecto –  
136 Opacidade: Translúcido (TR), Pouco Opaco (PO) ou Opaco (OP); Aspecto – Grumos:  
137 Presente (PR) ou Ausente (AU); Odor: Presente (PR) ou Ausente (AU); Cor: Presente  
138 (PR) ou Ausente (AU) (Brasil, 2004; Damasceno et al., 2016; Frange e Garcia, 2009). As  
139 formulações desenvolvidas que passaram pela análise, seguiram para o teste de  
140 estabilidade preliminar.

#### 141 2.3.2. Teste de estabilidade preliminar

142 As nanoemulsões foram armazenadas em recipientes estéreis vedados contendo  
143 um *head space* equivalente a 1/3 do volume total do recipiente para permitir trocas  
144 gasosas. Imediatamente após o preparo das formulações, as nanoemulsões foram  
145 submetidas a centrifugação a 1210 g por 30 minutos (Centrífuga Kacil CE-01) seguido  
146 de avaliação do Aspecto - Fase da dispersão: Homogênea (HM) ou Heterogênea (HT).  
147 Ainda, amostras diferentes foram utilizadas para os testes de estresse térmico onde foram  
148 avaliados por 24 h resfriamento ( $5 \pm 2$  °C), congelamento ( $-20 \pm 2$  °C) e aquecimento (37,  
149 40 e  $50 \pm 2$  °C). Após o teste, as nanoemulsões foram novamente avaliadas a temperatura  
150 ambiente ( $25 \pm 2$  °C) em relação a análise física macroscópica (2.3.1) sendo comparados  
151 os resultados imediatamente após a preparação. As nanoemulsões que passaram pelo  
152 teste, seguiram para caracterização físico-química.

#### 153 2.3.3. Caracterização físico-química

154 As nanoemulsões foram diluídas em água ultrapura para então serem submetidas  
155 a análise, reduzindo assim a turbidez sua mesma. Foram avaliados o tamanho médio (nm),  
156 índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (mV) das vesículas de óleo pela técnica de  
157 espectroscopia de correlação de fótons padrão (PCS) fixado 90° a 25 °C utilizando um  
158 Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) (Cadena et al., 2013; Pereira et al., 2019; Riquelme et  
159 al., 2019). As nanoemulsões foram diluídas em água ultrapura para então serem

160 submetidas a análise, reduzindo assim a turbidez sua mesma. Para isso, foram testadas  
161 amostras das nanoemulsões sem hormônio (brancas) e com propionato de testosterona  
162 nas concentrações de 0,6; 0,4 e 0,2 g em 10 g. Estes valores foram testados devido ao  
163 excipiente oleoso presente no Androgenol® (propionato de testosterona), com o intuito  
164 de avaliar sua interferência nos valores observados. Para tal, o volume de PT reduzido na  
165 formulação foi substituindo por água. As nanoemulsões produzidas seguiram para os  
166 testes de estabilidade. Os dados foram mensurados em triplicata.

#### 167 2.4. Incorporação das nanoemulsões à ração comercial

168 Foram preparadas 2 rações. A primeira delas seguiu para o teste de palatabilidade,  
169 onde foi produzida a partir de ração comercial extrusada macerada (40% de proteína  
170 bruta, Lanolis) numa proporção de 2:1:1 (ração:água:nanoemulsão), sendo estas  
171 nanoemulsões composta pelos óleos selecionados para a análise físico-química. Essa  
172 ração foi novamente repletizada e ficou em descanso por 24 h a temperatura ambiente  
173 ( $25 \pm 2$  °C) para secagem e ser oferecida aos animais. Para o teste de palatabilidade foram  
174 utilizadas apenas nanoemulsões brancas (sem hormônio). Para a experimentação, a  
175 nanoemulsão utilizada foi a que melhor se apresentou após a análise físico-química, onde  
176 foi adicionada a ração comercial extrusada macerada (40% de proteína bruta, Lanolis) e  
177 água destilada numa proporção de 100:10:1,5-4,5 (ração:água:nanoemulsão) e  
178 homogeneizadas, permanecendo em descanso por 4 horas a temperatura ambiente ( $25 \pm$   
179  $2$  °C) para secagem e seguir para o teste de reversão sexual. Estes valores de nanoemulsão  
180 (1,5 a 4,5 g) foram utilizadas para obter a concentração final de 30, 60 e 90 mg/kg de PT.  
181 Para o controle positivo, 0,6g de PT (60 mg) foram diluídos em 10 g de álcool absoluto  
182 sob as mesmas condições.

#### 183 2.5. Animais

184 Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia e  
185 Comportamento Animal - LECA, da Universidade Federal Rural de Pernambuco –  
186 UFRPE, biotério cadastrado na plataforma CIUCA-CONCEA (Conselho Nacional de  
187 Experimentação Animal). Todos os protocolos presentes neste projeto foram submetidos  
188 e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da UFRPE (Licença  
189 117/2019). Os alevinos da espécie *Oreochromis niloticus* foram adquiridos na Estação de  
190 Aquicultura Continental Johei Koike, da UFRPE. Toda a água dos aquários submetidos  
191 aos tratamentos passou por processo oxidativo avançado (POA) em um reator utilizando

192 foto-oxidação UV e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hansen & Andersen, 2012; Silva et al., 2019) antes de ser  
193 descartada visando degradar as moléculas usadas prevenindo a contaminação ambiental.

#### 194 2.5.1. *Teste de palatabilidade com juvenis*

195 A ração contendo as nanoemulsões selecionadas após os testes de estabilidade (0,5  
196 g/indivíduo) foi ofertada *ad libitum* a 30 indivíduos juvenis da espécie tilápia  
197 (*Oreochromis niloticus*) com peso médio de 10.5g. As rações foram ofertadas em dois  
198 dias consecutivos.

#### 199 2.5.2. *Administração dos tratamentos em larvas Oreochromis niloticus*

200 550 larvas com tamanho médio de 10mm (aproximadamente 12 dias de vida)  
201 foram aclimatadas até a completa absorção do saco vitelínico, mantidas com fotoperíodo  
202 (claro/escuro) 14/10, a temperatura de  $27 \pm 1$  °C e pH de  $7,0 \pm 0,5$ . Posteriormente, foram  
203 separadas em 5 grupos de 55 animais em duplicata mantidas às mesmas condições em  
204 aquários com capacidade de 10 L, onde foram alimentadas 6 vezes ao dia (8h, 10h, 12h,  
205 14h, 16h, 18h) com os seguintes tratamentos: i. Controle Negativo – Ração macerada sem  
206 hormônio; ii. Controle Positivo – Ração macerada com 60 mg/mL de propionato de  
207 testosterona em álcool (tratamento convencional); iii. Ração macerada e nanoemulsão na  
208 concentração de 30mg de propionato de testosterona; iv. Ração macerada e nanoemulsão  
209 na concentração de 60mg de propionato de testosterona; e v. Ração macerada e  
210 nanoemulsão na concentração de 90mg de propionato de testosterona. Durante a primeira  
211 quinzena, os animais foram alimentados com 0,160 g de ração macerada 6 vezes ao dia e  
212 2/5 do volume total da água dos aquários renovada 3 vezes por semana. Na segunda  
213 quinzena, os animais foram alimentados com 0,320 g de ração macerada 6 vezes ao dia e  
214 3/5 do volume total da água dos aquários renovada 3 vezes por semana, adaptando-se  
215 assim, ao crescimento dos animais. A indução hormonal teve duração de 30 dias. Os  
216 animais foram eutanasiados após 35 dias do início do tratamento, sendo os 5 dias finais,  
217 os animais sendo alimentados apenas com ração macerada sem hormônio.

#### 218 2.5.3. *Mensuração dos parâmetros morfológicos, coleta de gônadas e processamento do* 219 *material histológico*

220 Os animais submetidos a experimentação foram eutanasiados ao término dos 35  
221 dias por banho de imersão em água com solução alcóolica anestésica (Eugenol 300 mg/L  
222 diluídos em 1 mL de álcool absoluto) (Vidal et al., 2008). Em seguida, foram medidos  
223 o comprimento total dos animais (direção cabeça-cauda), altura da cabeça (direção dorso-

224 ventral) e diâmetro dos olhos com o auxílio de um paquímetro. Logo após, foi realizada  
225 uma abertura na cavidade abdominal dos animais e imediatamente imersos em solução  
226 Davidson e mantidos por 48 h para preservação dos órgãos. Posteriormente, os animais  
227 foram mantidos em álcool 70% para posterior retirada das gônadas. Parte da cavidade  
228 celomática foi preservada para que não houvesse danificação das gônadas e obter um  
229 melhor parâmetro de observação dos tecidos.

230 Após retiradas, as gônadas foram imersas em álcool 70% e guardadas para  
231 posterior preparação da lâmina histológica. 20 indivíduos selecionados aleatoriamente  
232 dos grupos experimentais passaram por esta fase para comprovação da reversão. Para  
233 emblocar, os órgãos foram posicionados em cassetes de processamento e serem expostos  
234 a banhos de etanol (70, 96 e 100%) e xilol. O material foi incluso em parafina, emblocados  
235 e posteriormente cortados utilizando um micrótomo manual (5 µm) (Leica RM2125  
236 RTS). Os cortes foram depositados em banho-maria e posicionados em lâminas (37 °C).  
237 Por fim, foram mantidos em estufa (55 °C) para retirada da parafina e seguir para a etapa  
238 de coloração das lâminas. Em seguida, as lâminas foram coradas utilizando o protocolo  
239 de hematoxilina e eosina. Ao término do processo, as lâminas foram finalizadas com  
240 Etellan para posteriormente serem lidas.

#### 241 *2.5.4 Sexagem por avaliação histológica das lâminas*

242 Foi realizada uma avaliação estrutural das células gonadais para determinação do  
243 sexo e acompanhamento do desenvolvimento gonadal utilizando um microscópio óptico  
244 com luz de LED (BIO2B SSI). Os animais foram considerados machos, fêmeas ou  
245 ovotestis (gônada intermediária).

### 246 **3. Resultados e Discussão**

#### 247 *3.1. Análise Física Macroscópica*

248 As características organolépticas das nanoemulsões foram avaliadas quanto ao seu  
249 aspecto visual e são mostrados na Tabela 1. Todas as formulações se mostraram  
250 homogêneas. Também foi observado que as formulações que possuíam em sua  
251 composição 5% p/p de Span® 80, com e sem propilparabeno, apresentaram consistência  
252 mais fluída (A1, A4, C1, C4, G1, G4, M1, M4, S1 e S4) em comparação com as demais.  
253 Ainda, à medida que essa concentração foi aumentada (10% e 15%), ficaram mais  
254 espessas apresentando consistências pouco espessa (A3 e A6), espessa (C6, G6, M6 e S6)  
255 ou muito espessa (C3, G3, M3 e S3). Em relação a opacidade, notou-se que as

256 nanoemulsões contendo propilparabeno se mostraram opacas quando comparadas às  
 257 nanoemulsões sem o conservante, com exceção da nanoemulsão S1 que se mostrou pouco  
 258 opaca. Apenas a nanoemulsão S5 possuiu grumos. Todas as formulações não  
 259 apresentaram odor ou cor.

260 As nanoemulsões sem propilparabeno se mostraram mais translúcidas e menos  
 261 espessas em comparação com as nanoemulsões que continham o conservante. Entretanto,  
 262 devido a nanoemulsão possuir óleos vegetais em sua composição e a mesma ser  
 263 incorporada à ração para peixes, as nanoemulsões sem propilparabeno foram descartadas,  
 264 ainda que interferiu na opacidade das formulações. Por se tratar de um produto orgânico,  
 265 há grande possibilidade de contaminação, tornando necessária a utilização de um  
 266 conservante. Diante disto, as nanoemulsões com propilparabeno foram utilizadas nos  
 267 próximos testes de estabilidade.

268

269 Tabela 1. Avaliação das características organolépticas das nanoemulsões óleo/água (O/A) contendo  
 270 propionato de testosterona quanto ao tipo de óleo vegetal utilizado, a presença ou ausência de  
 271 propilparabeno e proporções de Span 80® e Tween 80® imediatamente após o preparo (BRASIL, 2004;  
 272 DAMASCENO et al., 2016; Frange e Garcia, 2009).

Óleo	Amostra	Span® 80 (p/p)	Tween® 80 (p/p)	Parabeno	Aspecto				Odor	Cor
					Fase da dispersão	Consistência	Opacidade	Grumos		
Algodão	A1	5%	15%	PR	HM	FL	OP	AU	AU	AU
	A2	10%	10%	PR	HM	PE	OP	AU	AU	AU
	A3	15%	5%	PR	HM	PE	OP	AU	AU	AU
	A4	5%	15%	AU	HM	FL	TR	AU	AU	AU
	A5	10%	10%	AU	HM	PE	OP	AU	AU	AU
	A6	15%	5%	AU	HM	PE	OP	AU	AU	AU
Canola	C1	5%	15%	PR	HM	FL	OP	AU	AU	AU
	C2	10%	10%	PR	HM	PE	OP	AU	AU	AU
	C3	15%	5%	PR	HM	ME	OP	AU	AU	AU
	C4	5%	15%	AU	HM	FL	TR	AU	AU	AU
	C5	10%	10%	AU	HM	FL	PO	AU	AU	AU
	C6	15%	5%	AU	HM	ES	OP	AU	AU	AU
Girassol	G1	5%	15%	PR	HM	FL	OP	AU	AU	AU
	G2	10%	10%	PR	HM	PE	OP	AU	AU	AU
	G3	15%	5%	PR	HM	ME	OP	AU	AU	AU
	G4	5%	15%	AU	HM	FL	TR	AU	AU	AU
	G5	10%	10%	AU	HM	FL	PO	AU	AU	AU
	G6	15%	5%	AU	HM	ES	OP	AU	AU	AU

Milho	M1	5%	15%	PR	HM	FL	OP	AU	AU	AU
	M2	10%	10%	PR	HM	PE	OP	AU	AU	AU
	M3	15%	5%	PR	HM	ME	OP	AU	AU	AU
	M4	5%	15%	AU	HM	FL	TR	AU	AU	AU
	M5	10%	10%	AU	HM	FL	PO	AU	AU	AU
	M6	15%	5%	AU	HM	ES	OP	AU	AU	AU
Soja	S1	5%	15%	PR	HM	FL	PO	AU	AU	AU
	S2	10%	10%	PR	HM	PE	OP	AU	AU	AU
	S3	15%	5%	PR	HM	ME	OP	AU	AU	AU
	S4	5%	15%	AU	HM	FL	TR	AU	AU	AU
	S5	10%	10%	AU	HM	PE	OP	PR	AU	AU
	S6	15%	5%	AU	HM	ES	OP	AU	AU	AU

273

274

275

276

277

278

279

Legendas Propilparabeno: Presente (PR) ou Ausente (AU); Aspecto - Fase da dispersão: Homogênea (HM) ou Heterogênea (HT); Aspecto – Consistência: Fluída (FL), Pouco Espessa (PE), Espessa (ES) ou Muito Espessa (ME); Aspecto – Opacidade: Translúcido (TR), Pouco Opaco (PO) ou Opaco (OP); Aspecto – Grumos: Presente (PR) ou Ausente (AU); Odor: Presente (PR) ou Ausente (AU); Cor: Presente (PR) ou Ausente (AU).

280

### 3.2. Avaliação da Estabilidade Preliminar

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

Logo após sua preparação, as nanoemulsões foram submetidas a avaliação da estabilidade por centrifugação onde não foram observadas alterações nas suas características organolépticas ou separação de fases em comparação a formulação recém preparada (Tópico 3.1). As nanoemulsões submetidas ao resfriamento ( $5 \pm 2$  °C) por 24 h não apresentaram alterações ao retornar a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) (Tópico 3.1), porém, quando submetidas ao congelamento ( $-20 \pm 2$  °C) por 24 h, a emulsão S1 se mostrou opaca após descongelada em relação as demais. As nanoemulsões submetidas ao aquecimento a  $37$  e  $40 \pm 2$  °C não apresentaram alterações, com exceção a emulsão S1, que após aquecida em temperaturas de  $37$ ,  $40$  e  $50$  °C se mostrou opaca quando comparada ao período anterior ao aquecimento (pouco opaca) (Tópico 3.1). Entretanto, a  $50 \pm 2$  °C, todas as emulsões com 15% p/p de Tween® 80 (A1, C1, G1, M1, S1), consideradas as mais fluídas (Tabela 1), apresentaram separação de fases, sendo descartadas para os testes seguintes (Tabela 2). As emulsões A2 e G2 também tiveram separação de fases a  $50$  °C sendo também descartadas. É preferível que a nanoemulsão seja mais fluída por ser mais fácil de ser produzida sob agitação magnética. Devido as nanoemulsões com 15% p/p de Span® 80 ficarem espessas (Tabela 1), as formulações C2, M2 e S2 com 10% p/p de Span® 80 foram preferidas às demais, seguindo para os testes seguintes.

298 Tabela 2. Avaliação da estabilidade e características organolépticas das amostras contendo propionato de  
 299 testosterona nanoemulsionada após centrifugação imediatamente após o preparo e após estresse térmico  
 300 por aquecimento ( $50 \pm 2^\circ\text{C}$ ) após retorno a temperatura ambiente (BRASIL, 2004; DAMASCENO et al.,  
 301 2016; Frange e Garcia, 2009).

<i>Aquecimento <math>50 \pm 2^\circ\text{C}</math></i>						
Amostra	Aspecto				Odor	Cor
	Fase da dispersão	Consistência	Opacidade	Grumos		
A1	HT	FL	OP	AU	AU	AU
A2	HT	PE	OP	AU	AU	AU
A3	HM	PE	OP	AU	AU	AU
C1	HT	FL	OP	AU	AU	AU
C2	HM	PE	OP	AU	AU	AU
C3	HM	ME	OP	AU	AU	AU
G1	HT	FL	OP	AU	AU	AU
G2	HT	PE	OP	AU	AU	AU
G3	HM	ME	OP	AU	AU	AU
M1	HT	FL	OP	AU	AU	AU
M2	HM	PE	OP	AU	AU	AU
M3	HM	ME	OP	AU	AU	AU
S1	HT	FL	OP	AU	AU	AU
S2	HM	PE	OP	AU	AU	AU
S3	HM	ME	OP	AU	AU	AU

302 Legendas Propilparabeno: Presente (PR) ou Ausente (AU); Aspecto - Fase da dispersão: Homogênea (HM)  
 303 ou Heterogênea (HT); Aspecto – Consistência: Fluída (FL), Pouco Espessa (PE), Espessa (ES) ou Muito  
 304 Espessa (ME); Aspecto – Opacidade: Translúcido (TR), Pouco Opaco (PO) ou Opaco (OP); Aspecto –  
 305 Grumos: Presente (PR) ou Ausente (AU); Odor: Presente (PR) ou Ausente (AU); Cor: Presente (PR) ou  
 306 Ausente (AU).

307

### 308 3.3. Avaliação Físico-química

309 Os resultados foram mensurados em triplicata e a média dos valores foram  
 310 expressos na Tabela 3.

311

312 Tabela 3. Avaliações de tamanho médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das nanoemulsões  
 313 óleo em água (O/A) de óleo de Soja, Canola e Milho com propionato de testosterona (PT) e brancas (B).  
 314 Avaliações de tamanho médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das nanoemulsões óleo em  
 315 água (O/A) de óleo de Soja, Canola e Milho com propionato de testosterona (PT) e brancas (B) Análise do  
 316 Zetasizer após a preparação de emulsões sem hormônio e contendo Propionato de Testosterona  
 317 encapsulados.

Formulação Produzida	Tamanho Médio (nm)	PDI	$\zeta$ (mv)
B - Canola	54,26	0,398	-27,6
B - Milho	43,73	0,481	-35,7
B - Soja	163,9	0,395	-38,1
0,6 g de PT - Canola	162,4	0,508	-37,0
0,6 g de PT - Milho	139,9	0,472	-37,6
0,6 g de PT- Soja	212,4	0,408	-39,1
0,4 g de PT- Canola	154,7	0,305	-31,8
0,4 g de PT - Milho	131,1	0,396	-36,3
0,4 g de PT - Soja	136,6	0,276	-31,5
0,2 g de PT - Canola	90,63	0,316	-35,8
0,2 g de PT - Milho	75,97	0,348	-35,8
0,2 g de PT - Soja	74,43	0,35	-36,2

318

319 As nanoemulsões produzidas são caracterizadas como nanoemulsões devido ao  
 320 seu tamanho, com vesículas medindo menos de 200 nm, com exceção da nanoemulsão  
 321 contendo 0,6 g de PT e óleo de soja. Já em relação ao índice de polidispersão (PDI), é  
 322 preferível que os valores estejam abaixo de 0,7, já que indica pouca variação de tamanho  
 323 das vesículas, sendo preferido valores próximos a 0,3, indicando maior homogeneidade  
 324 (CADDEO et al., 2008). Valores abaixo de 0,7 foram obtidos em todas as nanoemulsões.  
 325 Em relação ao potencial zeta ( $\zeta$  - mv) nas nanoemulsões, os valores ficaram entre -27,6 e  
 326 -39,1, o que é considerado bom, pois valores mais próximos de zero indicam menor  
 327 magnitude de interação das forças de repulsão entre as vesículas e agregação com perda  
 328 da estabilidade. A nanoemulsões produzidas apresentaram valores negativos indicando  
 329 maior magnitude de interação das forças de repulsão entre as vesículas, garantindo sua  
 330 estabilidade. Devido ao propionato de testosterona utilizado ser disperso em um veículo  
 331 oleoso (Androgenol®), foi observado que a presença deste veículo interferiu diretamente  
 332 no tamanho das vesículas quando comparadas as formulações brancas. Entretanto, houve  
 333 pouca variação em relação ao PDI e o potencial zeta. De acordo com os dados  
 334 apresentados, a formulação que apresentou melhores parâmetros para uso comercial foi a  
 335 nanoemulsão de óleo de soja contendo 0,2 g / 10 g de emulsão de propionato de  
 336 testosterona, correspondendo ao menor tamanho vesícula, menor PDI e maior Potencial  
 337 Zeta.

338 A utilização de Tween 80 e Span 80 como surfactantes na produção das  
 339 nanoemulsões se mostrou bastante satisfatória, sendo possível obter vesículas de até 43  
 340 nanômetros nos testes realizados. Isto ocorre, pois são surfactantes que necessitam de  
 341 pouca energia para produção destes nanossistemas, segundo Fernandes (2014). Ainda,  
 342 são tensoativos não-iônicos e biocompatíveis, amplamente utilizados na indústria,  
 343 principalmente a farmacêutica, por geralmente serem compatíveis com outros  
 344 surfactantes e não sofrerem muitas alterações físico-químicas (Daltin, 2011).

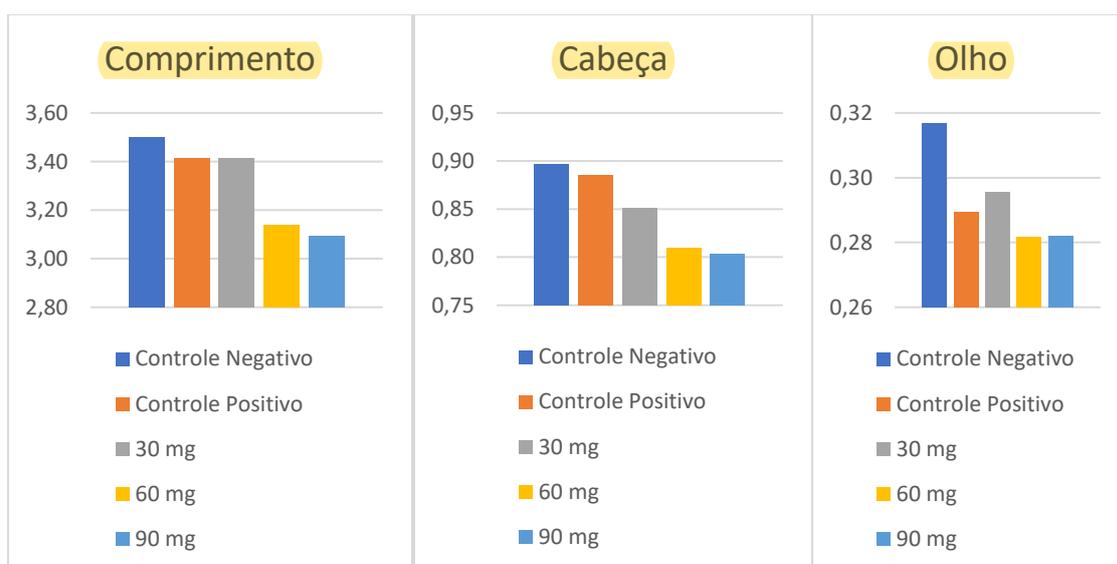
345

#### 346 3.4. Avaliação do crescimento, mortalidade e quantificação de animais revertidos 347 sexualmente por avaliação histológica das gônadas

348

349 Os dados de comprimento total dos animais, altura da cabeça e diâmetro dos olhos  
 350 foram expressos na Figura 1.

351



352

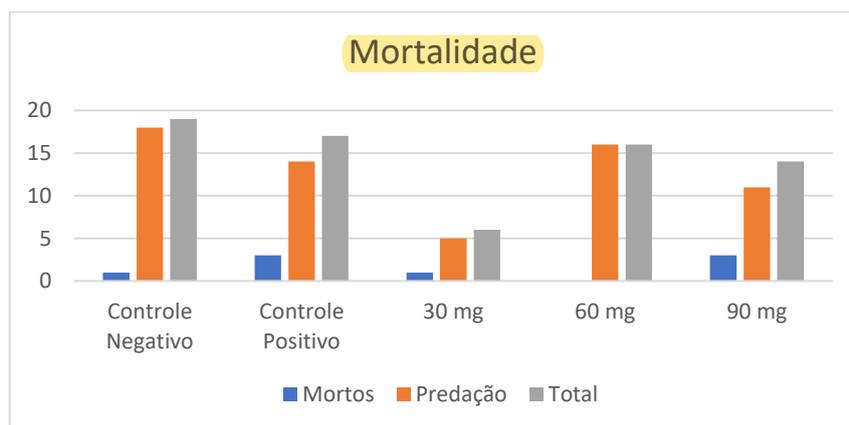
353 Figura 1. Avaliação do comprimento total dos animais, altura da cabeça e diâmetro do olho dos animais  
 354 testados. Grupos: Controle Negativo, Controle Positivo, 30 mg/kg, 60 mg/kg e 90 mg/kg.

355

356 Foi constatado que o grupo Controle Negativo teve uma taxa de crescimento maior  
 357 em relação aos grupos experimentais e o Controle Positivo. Isto pode indicar que a  
 358 presença da testosterona provoque uma redução nessa taxa durante as primeiras fases de  
 359 desenvolvimento. O grupo de 30 mg/kg apresentou resultados semelhantes ao Controle  
 360 Positivo, entretanto apresentou uma redução no crescimento da altura da cabeça e um

361 aumento no diâmetro dos olhos. Estes valores podem indicar uma menor toxicidade do  
 362 composto. Os grupos de 60 mg/kg e 90 mg/kg obtiveram taxas semelhantes, entretanto,  
 363 o grupo de 90 mg/kg foi o que apresentou a menor taxa de crescimento, principalmente  
 364 em relação ao comprimento total e altura da cabeça, com exceção do diâmetro dos olhos  
 365 em relação ao grupo 60 mg/kg.

366 A mortalidade dos animais durante a experimentação foi contabilizado e está  
 367 expresso na **Figura 2**.



368  
 369 Figura 2. Avaliação da Mortalidade nos grupos testados por morte natural, predação e contagem total.  
 370 Grupos: Controle Negativo, Controle Positivo, 30 mg/kg, 60 mg/kg e 90 mg/kg.

371

372 Foi constatado que a maior proporção de mortalidade nos grupos testados foi  
 373 decorrente de predação, uma característica da espécie. O grupo de 30 mg/kg obteve a  
 374 menor taxa de mortalidade, com apenas 5,45% em relação ao número total. Valores  
 375 semelhantes foram obtidos nos grupos Controle Positivo e 60 mg/kg com 15,45% e  
 376 14,55% respectivamente, sendo em 60 mg/kg as mortes decorrentes apenas de predação.  
 377 O grupo de 90 mg/kg apresentou mortalidade de 12,73%. O grupo com maior mortalidade  
 378 foi o Controle Negativo com 17,27%.

379 Na avaliação da eficiência da reversão, foi observado uma grande incidência de  
 380 ovotestis, gônadas contendo ovogônias e espermatogônias simultaneamente. Para  
 381 classificação, foi realizada uma classificação qualitativa, onde foram considerados  
 382 ovotestis com predominância masculina ou feminina observando uma frequência de 5:2  
 383 (espermatogônias:ovogônias ou vice-versa). No caso de proporções equivalentes, foram  
 384 classificados como ovotestis indefinidos. Os parâmetros utilizados estão expressos na  
 385 Figura 3. Foi possível observar que, no controle negativo, houve uma incidência 100%  
 386 de ovotestis, sendo 30% correspondente a ovotestis com proporções equivalentes de

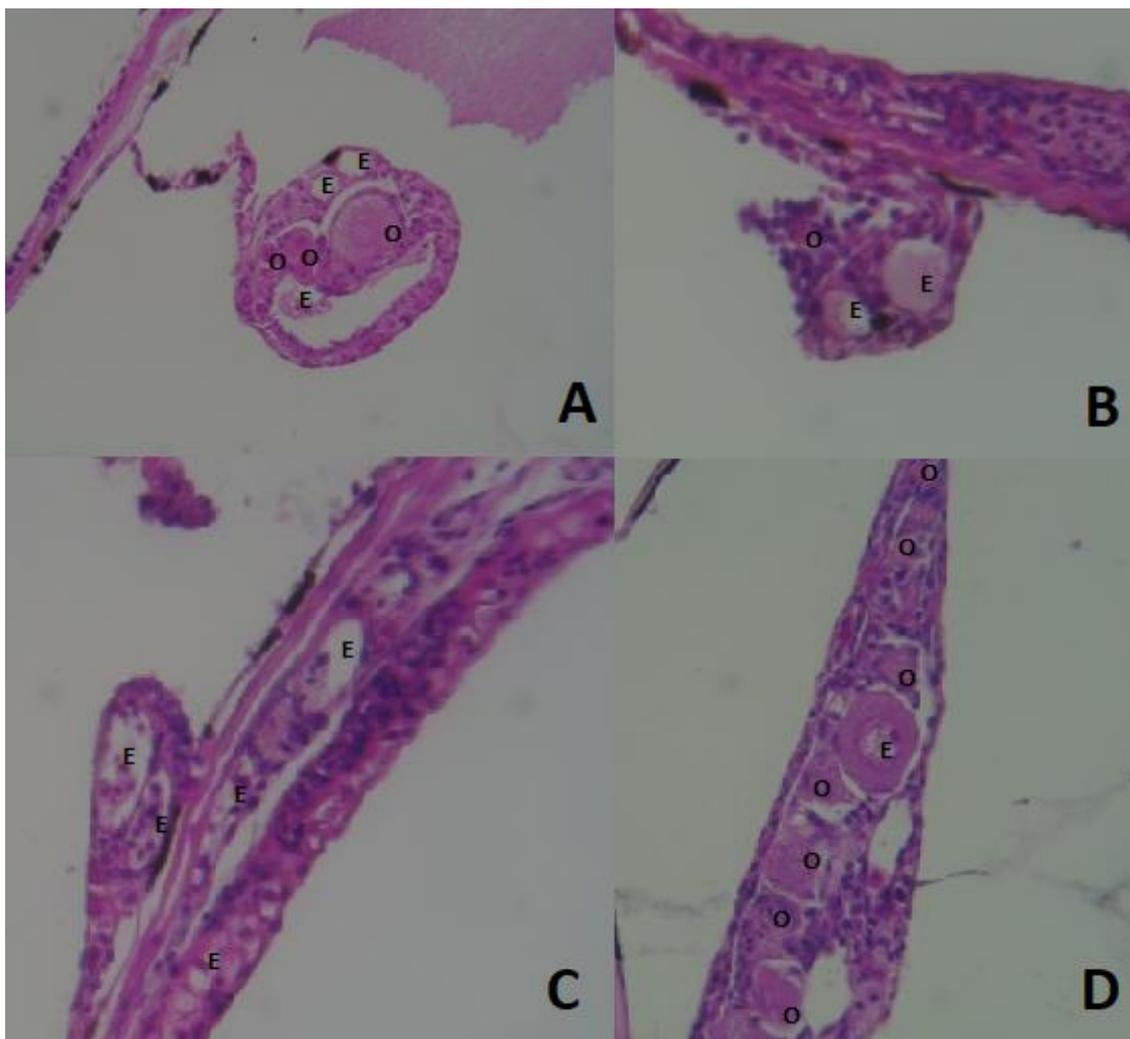
387 células gonadais femininas e masculinas, 10% correspondente a ovotestis com células  
388 predominantemente masculinas e 60% de ovotestis com células predominantemente  
389 femininas. Já o grupo controle positivo, foi observado uma taxa de 60% de reversão e  
390 40% de ovotestis, sendo 30% correspondente a gônadas com células predominantemente  
391 masculinas e apenas 10% com células predominantemente femininas. Ainda, foi possível  
392 observar neste grupo experimental fases avançadas de desenvolvimento destas células  
393 masculinas nos animais revertidos.

394 Foi possível observar que no grupo tratado com 30 mg de PT houve 35% reversão,  
395 mas também uma grande predominância de ovotestis com proporções semelhantes de  
396 ovogônias e espermatogônias, equivalente a 40%. Ainda, 10% ovotestis com células  
397 gonadais predominantemente masculinas e 15% correspondiam a ovotestis de células  
398 gonadais predominantemente femininas.

399 Já no grupo tratado com 60 mg de PT, foi obtida a taxa de reversão de 50% de  
400 reversão, 20% de ovotestis com células gonadais predominantemente masculinas, 20 %  
401 de ovotestis com predominância feminina e 10% de células gonadais masculinas e  
402 femininas com proporções semelhantes.

403 No grupo tratado com 90 mg de PT foi obtida uma taxa de 45% de reversão e  
404 apenas 10% de ovotestis com células gonadais predominantemente masculinas. Os 45%  
405 restantes, correspondiam a 10% de ovotestis de predominância masculina e 35% de  
406 ovotestis com proporções semelhantes. Em nenhum dos grupos, foram observadas  
407 gônadas efetivamente femininas. Os resultados estão expressos na Tabela 4.

408  
409



410

411 Figura 3. Observação histológica de gônadas ovotestis indefinidos (A), ovotestis predominantemente  
 412 masculinos (B), gônadas masculinas (C) e ovotestis predominantemente femininos (D). Legenda: O –  
 413 Ovogônias; E- Espermatozônias.

414

415 **Tabela 4.** Porcentagem de animais revertidos (machos), fêmeas e ovotestis (indefinido, predominantemente  
 416 machos e predominantemente fêmeas)

	Machos	Fêmeas	Ovotestis Indefinido	Ovotestis Predom. Macho	Ovotestis Predom. Fêmea
Controle Negativo	-	-	30%	10%	60%
Controle Positivo	60%	-	-	30%	10%
30 mg/kg	35%	-	40%	10%	15%

60 mg/kg	50%	-	10%	20%	20%
90 mg/kg	45%	-	35%	10%	10%

417

418 A utilização de sistemas nanotecnológicos para a reversão sexual peixes vêm  
 419 sendo exploradas e disponibilizadas na literatura com resultados satisfatórios. Devido ao  
 420 tamanho nanométrico, é possível. Resultados semelhantes são observados na literatura,  
 421 como no trabalho descrito por Joshi et al., (2019), onde utiliza um inibitor de aromatase  
 422 encapsulada em nanopartículas de PLGA, obtendo taxas de reversão de até 89%,  
 423 reduzindo também a quantidade de inibitor necessária.

424 As nanoemulsões são sistemas nanotecnológicos que se sobressaem em relação a  
 425 outros sistemas, pois possuem maior capacidade de retenção e estabilidade, pois devido  
 426 ao tamanho de suas vesículas, resistem a gravidade (Anton; Vandamme, 2011;  
 427 McClements, 2012). Ainda que a nanoemulsão tenha obtido uma taxa de reversão  
 428 reduzida, a utilização deste nanossistema apresenta vantagens em relação ao já disponível  
 429 na literatura, já que se trata de um produto com a testosterona presente já dentro da ração.  
 430 Este fator reduz consideravelmente a contaminação do produtor rural que não necessitará  
 431 entrar em contato direto com o hormônio, que poderia provocar diversos problemas no  
 432 sistema reprodutor como alterações de fertilidade e câncer (Sifakis et al., 2017).

433 Foi observado também que houve um possível retardo na liberação do hormônio  
 434 nos grupos testados, principalmente nos grupos de 30 mg/Kg e 60 mg/Kg em relação ao  
 435 Controle Positivo. Isso indica uma possível liberação controlada. Sistemas de Liberação  
 436 Controlada possuem diversas vantagens em relação as formulações tradicionais, pois por  
 437 liberar a substância de maneira ponderada, protege-a e permite a redução da dose  
 438 necessária, reduzindo também os possíveis efeitos colaterais decorrentes de seu uso  
 439 (Bhowmik et al., 2014; Park, 2014). Diante disto, recomendamos futuros estudos com  
 440 mudança na metodologia de reversão sexual sendo adaptada ao uso de sistemas  
 441 nanotecnológicos.

442 Para as técnicas de reversão sexual utilizadas na indústria, é comum a utilização  
 443 da concentração de 60 mg/Kg de 17 $\alpha$ -metiltestosterona por quilo de ração (Zanardi et al.,  
 444 2011). Ainda assim, outras testosteronas e seus ésteres também podem ser utilizados  
 445 (Abo-Al-Ela, 2018). Entretanto, foi observado que em relação ao grupo de 90 mg/Kg,  
 446 mesmo aumentando a concentração de testosterona, a reversão não aumentou

447 proporcionalmente, inclusive reduzindo numa taxa de 5% em relação ao grupo de 60  
448 mg/Kg. Ainda, foi o grupo que apresentou o menor crescimento em relação aos demais  
449 (Fig. 2). Isto pode indicar que o aumento da testosterona, neste caso, pode aumentar a  
450 toxicidade e estresse.

## 451 **5. Conclusão**

452 Diante dos resultados obtidos é possível concluir que a nanoemulsão é capaz de  
453 fazer a reversão sexual em alevinos da espécie *Oreochromis niloticus* nas concentrações  
454 testadas. A concentração que apresentou resultados mais satisfatórios foi de 60 mg. Com  
455 isso, torna-se viável a produção de uma ração utilizando uma nanoemulsão para a  
456 liberação de testosterona, se mostra um método mais seguro e eficiente para a  
457 administração deste hormônio na aquicultura na reversão sexual de tilápias, já que o  
458 sistema permite o uso de um produto pronto, o que pode diminuir o impacto ambiental,  
459 além proporcionar mais segurança ao produtor rural.

## 460 **6. Agradecimentos**

461 A Universidade Federal Rural de Pernambuco, ao CNPq (Conselho Nacional de  
462 Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa PIBITI e bolsa de produtividade  
463 DT-2 (Processo 310401/2017-8) pelo apoio financeiro. A Universidade Federal de  
464 Pernambuco pela disponibilidade do LarNano e a todos os membros envolvidos nesta  
465 pesquisa.

466

## 467 **7. Referências Bibliográficas**

468

469 ABO-AL-ELA, Hormones and fish monosex farming: A spotlight on immunity. **Fish and**  
470 **Shellfish Immunology**, 72: 23–30, 2018.

471

472 ALMEIDA, J. K. P. et al. Caracterizações físico-químicas de óleos vegetais utilizados  
473 para produção de biodiesel com metodologias alternativas simples. XXXI Encontro  
474 nacional de engenharia de produção. **Abrepo**. Belo Horizonte, MG, Brasil, 04 a 07 de  
475 outubro de 2011.

476

477 ANTON, N.; VANDAMME, T. E. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications  
478 of the Critical Differences, **Pharmaceutical Research**, 28: 978– 985, 2011.

- 479  
480 BHOWMIK, D. et al. Controlled Release Drug Delivery Systems, **The Pharma**  
481 **Innovation Journal**, 1(10): 24-32, 2012.  
482
- 483 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de  
484 estabilidade de produtos cosméticos. Brasília: ANVISA; 2004. 52p. (Séries Temáticas.  
485 Qualidade, v.1). acessado em: 10/08/2019. Disponível em: [http://](http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm)  
486 [www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia\\_series.htm](http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm).
- 487 BATISTA, A. J. S.; PEPE, V. L. E. Os desafios da nanotecnologia para a vigilância  
488 sanitária de medicamentos, **Ciência & Saúde Coletiva**, 19(7): 2105-2114, 2014.
- 489 CADENA, P. G. et al. Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic  
490 liposomes, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1828: 309-316, 2013.
- 491 DALTIM, D. **Tensoativos**: química, propriedades e aplicações, São Paulo: Blucher, 2011,  
492 325 p.
- 493 DAMASCENO, G. A. B. et al. Use of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill extracts from  
494 Brazilian Caatinga as an alternative of natural moisturizer in cosmetic formulations,  
495 **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 52(3): 459-470 2016.
- 496 FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Cultured  
497 Aquatic Species Information Programme *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758).  
498 Disponível em: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis\\_niloticus/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en).  
499 Acessado em: 10/10/2019.
- 500 FERNANDES, C. P. Desenvolvimento de uma nanoemulsão bioinseticida preparada com  
501 extrato de *Manilkara subsericea*, Rio de Janeiro, 2014. Tese (Doutorado em  
502 Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal - Centro de  
503 Ciências da Saúde - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 504 FRANGE, R. C. C.; GARCIA, M. T. J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água:  
505 avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**,  
506 30(3): 263-271, 2009.

- 507 GORE, A. C. et al. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on  
508 Endocrine-Disrupting Chemicals. **Endocrine Review**. 36(6): E1–E150, 2015.
- 509 HANSEN, K. M. S.; ANDERSEN, H. R. Energy Effectiveness of Direct UV and  
510 UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Treatment of Estrogenic Chemicals in Biologically Treated Sewage.  
511 **International Journal of Photoenergy**, p. 1 – 9, 2012
- 512 JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug  
513 delivery system, **3 Biotech**: 5:123–127, 2015.
- 514 JOSHI, H. D. et al. Application of nanotechnology for the production of masculinized  
515 Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), **Aquaculture**, 511: 1921-1925, 2019.
- 516 McCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences  
517 and similarities, **Soft Matter**, 8: 1719–1729, 2012.
- 518 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Normativa N°49, 22 dez  
519 de 2006, 11 p.
- 520 MÖRSCHBÄCHER, E. F.; MARENGONI, N. G.; ALBUQUERQUE, D. M.  
521 Mananoligossacarídeo durante a reversão sexual de tilápia do Nilo. **Bioscience Journal**,  
522 30(4): 1168-1176, 2014.
- 523 ÖZTÜRK, B. Nanoemulsions for food fortification with lipophilic vitamins: Production  
524 challenges, stability, and bioavailability, **European Journal of Lipid Science and**  
525 **Technology**, 119, 18p, 1500539, 2017.
- 526 PARK, K. The Controlled Drug Delivery Systems: Past Forward and Future Back,  
527 **Journal Controlled Release**. v. 28; 190: 3–8, 2014.
- 528 PEREIRA et al. Poly (anhydride) nanoparticles containing cashew nut proteins can  
529 induce a Strong Th1 and Treg immune response after oral administration, **European**  
530 **Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 127: 51-60, 2019.

- 531 RIQUELME, N.; ZUNIGA, R. N.; ARANCIBIA, C. Physical stability of nanoemulsions  
532 with emulsifier mixtures: Replacement of tween 80 with quillaja saponin, **Food Science  
533 and Technology**, 111: 760-766, 2019.
- 534 SALEM, M. A.; EZZAT, S. M. **Nanoemulsions in Food Industry**: Some New Aspects  
535 of Colloidal Systems in Food, Capter 3: 31-51, 2018.
- 536 SIFAKIS, S.; ANDROUTSOPOULOS, V.P.; TSATSAKIS, A. M; SPANDIDOS, D.A.  
537 Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female  
538 reproductive systems. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 51: 56-70, 2017.
- 539 SILVA, M. C. G. et al. The complexation of steroid hormones into cyclodextrin alters the  
540 toxic effects on the biological parameters of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, 214:  
541 330-340, 2019.
- 542 SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts development and applications in drug  
543 delivery, **Journal of Controlled Release**, 252: 28-49, 2017.
- 544 VIDAL, L. V. O. et al. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa  
545 Agropecuária Brasileira**. 43: 1069 -1074, 2008.
- 546 VOLKOVA, K. et al. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to 17 $\alpha$ -  
547 ethinylestradiol affects non-reproductive behavior and fertility as adults, and increases  
548 anxiety in unexposed progeny, **Hormones and Behavior**, 73: 30-38, 2015.
- 549 WU, H. et al. Monitoring the contents of six steroidal and phenolic endocrine disrupting  
550 chemicals in chicken, fish and aquaculture pond water samples using pre-column  
551 derivatization and dispersive liquid–liquid microextraction with the aid of experimental  
552 design methodology. **Food Chemistry**, 192: 98–106, 2016.
- 553 ZANARDI, M. F. et al. Concentrações de hormônio na carcaça de tilápias-do-Nilo e  
554 maturação precoce após reversão sexual, **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30(1): 7-11,  
555 2011.

556 ZANONI, M. A. et al. Inversão sexual de alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis*  
557 niloticus) variedade Supreme, submetidos a diferentes temperaturas durante fase de  
558 diferenciação sexual, **Semina: Ciências Agrárias**, 34(1): 455-466, 2013.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi descrito um processo de obtenção e caracterização de uma nanoemulsão Óleo/Água (O/A) a ser utilizada como aditivo alimentar na aquicultura para atuar na reversão sexual de Tilápias. Diante disso, conclui-se que:

- Foi realizado um monitoramento tecnológico para fazer um levantamento das técnicas utilizadas para reversão sexual existentes para conhecer o mercado atual;
- Uma emulsão O/A estável contendo testosterona encapsulada foi produzida;
- Os parâmetros físico-químicos e organolépticos da emulsão foram mensurados, tornando possível escolher o óleo de soja como o melhor para a formulação das emulsões;
- A nanoemulsão foi incorporada a ração extrusada para o desenvolvimento do produto;
- A palatabilidade da ração contendo a nanoemulsão para a espécie *Oreochromis niloticus* foi constatada;
- Os parâmetros morfológicos dos animais submetidos aos tratamentos foram mensurados para avaliar a atuação do produto;
- A eficiência da nanoemulsão como indutor da reversão sexual por meio de histologia das gônadas foi comprovada;
- Um pedido de patente do aditivo alimentar a partir de uma nanoemulsão foi depositado.

## 8. ANEXOS – PRODUÇÕES

### 8.1. Artigos completos publicados em periódicos

1 - BITTENCOURT, T. Q. M. ; SANTOS, A. R. ; SILVA, M. C. G. ; SILVA, J. F. ; SILVA, N. P. C. ; SILVA, W. E. ; CADENA, P. G. ; AMORIM, M. J. A. A. L. . Toxic effects of vanadium compounds on biological parameters of embryos and adults of zebrafish (*Danio rerio*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 70, p. 1877-1886, 2018.

2 - SILVA, MARÍLIA CORDEIRO GALVÃO DA ; SILVA, JADSON FREITAS DA ; SANTOS, THAMIRIS PINHEIRO ; SILVA, NIELY PRISCILA CORREIA DA ; SANTOS, AMANDA RODRIGUES DOS ; ANDRADE, ANDRÉ LUCAS CORRÊA DE

; SOUZA, ELTON HUGO LIMA DA SILVA ; SALES CADENA, MARILIA RIBEIRO ; SÁ, FABRÍCIO BEZERRA DE ; SILVA JUNIOR, VALDEMIRO AMARO DA ; CADENA, PABYTON GONÇALVES . The complexation of steroid hormones into cyclodextrin alters the toxic effects on the biological parameters of *zebrafish* (*Danio rerio*). CHEMOSPHERE, v. 214, p. 330-340, 2019.

3 - SANTOS, T. P. ; SOARES, P. R. L. ; SILVA, M. C. G. ; SILVA, S. C. B. L. ; ANDRADE, A. L. C. ; SANTOS, A. R. ; SILVA, J. F. ; OLIVEIRA, E. G. S. ; SOUZA, E. H. L. S. ; SA, F. B. ; CADENA, M. R. S. ; CADENA, P. G. . Thyroxine, levothyroxine, and thyroxine complexed into cyclodextrin changed animal behavior, oxygen consumption, and photopic electroretinogram of *Colossoma macropomum*. FISH PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 2019.

#### 8.2. Trabalhos publicados em anais de evento

“EFEITOS TÓXICOS CAUSADOS PELA DISPONIBILIDADE DA GLIBENCLAMIDA, UTILIZADA NO TRATAMENTO DO DIABETES, COMO DISRUPTOR ENDÓCRINO SOB OS PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *Danio rerio*”, de autoria de Niely Priscila Correia da Silva, Tiago Queiroz da Mota Bittencourt, Jadson Freitas da Silva, Amanda Rodrigues dos Santos, Wilka Mirely Constantino Correia, Thamiris Pinheiro Santos, Marília Cordeiro Galvão da Silva, Renata Meireles de Oliveira Padilha e Pabyton Gonçalves Cadena. XXIX CIC 2019.

#### 8.3. Patentes

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM CREME PARA USO VETERINÁRIO A PARTIR DE UMA NANOEMULSÃO ÓLEO/ÁGUA CONTENDO HORMÔNIOS ESTEROIDES – BR 10 2018 068629 1 – Data de depósito: 14/09/2018

LARVICIDA ORGÂNICO E BIODEGRADÁVEL CONTENDO LECTINA PRODUZIDO A PARTIR DE MICRO-ORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES – BR 10 2018 073581 0 – Data de depósito: 14/11/2018

COMPOSIÇÃO BIOINSETICIDA A BASE DE ENDOTOXINA DO BACILLUS THURINGIENSIS LIVRE DE ESPOROS ENCAPSULADA VIA MICROEMULSÃO

ÁGUA/ÓLEO E SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO – BR 10 20190149 2 – Data de depósito: 17/07/2019

#### 8.4. Outras informações relevantes:

Desde o início de 2018 realizei cursos de curta duração online (ofertados pelas universidades UEMA e USP) e curso de inglês (atualmente estou no nível Intermediário). Fui membro da Comissão Organizadora do XXIX CIC – Congresso de Iniciação Científica que ocorreu entre os dias 11 e 13 de novembro de 2019. Fui membro da Comissão Organizadora do II CNAS que ocorreu nos dias 14 a 17 de outubro de 2019 e sou membro da edição 2020 que ocorrerá nos dias 20 a 22 de outubro. Sou membro da Comissão Organizadora do I CIEPEX - Congresso Internacional de Ensino Pesquisa e Extensão, edição 2020. Registrei uma marca 2019: Sistema JEPEX, Número do registro: 918643090. Ministrei o minicurso intitulado “Inovação Tecnológica – Introdução à Patentes” na III -Semana Urticante (28 a 30 de Maio/2019 – UFRPE/SEDE). Ministrei o minicurso intitulado “Propriedade Industrial: Introdução à Patentes” no I -Congresso de Neuro-Fisiologia (06 a 8/11 de 2019 - UFPE). Ministrei a Oficina “Propriedade Intelectual na área de educação” na IX Mostra LecBio, no dia 19/12/2019 no Departamento de Biologia – UFRPE. Fui avaliadora de trabalhos na IX Mostra LecBio. Fui avaliadora de trabalhos no 25º Ciência Jovem. Ministrei a palestra “Desvendando a Propriedade Industrial” no III CONAAS - Congresso Online Nacional de Animais Silvestres, 2019. Também acompanho alunos de Iniciação Científica e realizo cooperações com outros laboratórios e alunos do PGBA. Fui aprovada em 3º Lugar na Seleção do Doutorado do PGBA/UFPE - Edital 2020.1.

## 8.5. Licença CEUA Nº 117.2019 para realizar a experimentação com os animais

 <b>UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO</b> Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE		<b>CEUA - UFRPE</b> Aprovado em: <u>18/09/2019</u> Validade: 1-19 <u>18/09/2021</u>
<b>Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA</b> <b>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.</b>		
Número da licença	117 /2019	
Número do processo	23082.019267/2019-21	
Data de emissão da licença	18 de setembro de 2019	
Título do Projeto	Desenvolvimento de uma ração nanotecnológica contendo um sistema de liberação controlada nanoemulsionado de testosterona com aplicações na aquicultura para a reversão sexual de peixes.	
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão).	Pesquisa	
Responsável pela execução do projeto	Pabyton Gonçalves Cadena	
Colaboradores	Amanda Rodrigues dos Santos, Ester Inácio Damião Quinova, Mathéus Victor Viana de Melo	
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Peixe macho 520, fêmea 520. Total: 1.040	