



OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MUCOADESIVAS CONTENDO CARVACROL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* CONTRA *Streptococcus agalactiae*

Paula **Banhara**¹; Márcia Regina **Assalin**²; Ana Lúcia **Penteado**³; Sonia Claudia do Nascimento de **Queiroz**⁴

Nº 20416

RESUMO – Um dos grandes desafios na piscicultura é a ocorrência de doenças. Diferentes antibióticos comerciais são utilizados para controlar essas doenças, porém, seu uso prolongado pode levar à resistência de tais medicamentos. Deste modo, faz-se necessário o uso de métodos alternativos e inovadores para o controle sanitário em peixes. Os óleos essenciais apresentam-se como uma boa alternativa. No entanto, fatores como a baixa solubilidade em água e volatilidade limitam seu uso. Neste trabalho, nanopartículas poliméricas carregadas com carvacrol foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, utilizando-se poly-ε-caprolactone (PCL) e quitosana. A eficiência de encapsulamento foi determinada de forma indireta, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por arranjo de diodos, utilizando calibração externa para quantificação do carvacrol. A atividade antimicrobiana *in vitro* da nanopartícula carregada com carvacrol foi avaliada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente à bactéria *Streptococcus agalactiae*. Carvacrol foi satisfatoriamente encapsulado pelo método de nanoprecipitação, com eficiência de encapsulamento de 69,64±4,42%. Os resultados de CIM e CBM obtidos para o carvacrol encapsulado e isolado foram iguais, sendo de 62,5 µg/ml e 390,625 µg/ml, respectivamente, evidenciando o aumento do efeito inibitório do carvacrol quando na forma nanoencapsulada. Os estudos preliminares realizados abrem perspectivas para soluções mais seguras e eficazes que empregam compostos de origem vegetal para o controle de doenças em peixe.

Palavras-chaves: Nanoprecipitação; sanidade, tilápia, bacterioses, óleos essenciais.

1 Autora, Bolsista CNPq (ITI-A): Graduação em Tecnologia em Processos Químicos, FATEC, Campinas-SP; paula1989banhara@gmail.com.

2 Analista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna – SP.

3 Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna – SP.

4 Orientadora: Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna – SP; sonia.queiroz@embrapa.br.



ABSTRACT – *One of the great challenges to be overcome in fish farming is the occurrence of diseases. Different commercial antibiotics are used to control these diseases; however, their prolonged use can lead to the resistance of such drugs. It is necessary to use alternative and innovative methods for sanitary control in fish. Essential oils are a good alternative. However, factors such as low water solubility and volatility limit its use. In this work, polymeric nanoparticles loaded with carvacrol were prepared by the nanoprecipitation method, using poly-ε-caprolactone (PCL) and chitosan. The encapsulation efficiency was indirectly determined, using high performance liquid chromatography and detection by diode array, using external calibration to quantify the carvacrol. The in vitro antimicrobial activity of the nanoparticle loaded with carvacrol was evaluated by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (CBM) against the bacterium Streptococcus agalactiae. Carvacrol was satisfactorily encapsulated by the nanoprecipitation method, with encapsulation efficiency of $69.64 \pm 4.42\%$. The MIC and CBM results obtained for the encapsulated and isolated carvacrol were the same, being $62.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ and $390.625 \mu\text{g} / \text{ml}$, respectively, showing the increased inhibitory effect of carvacrol when in the nanoencapsulated form. The preliminary studies carried out open perspectives for safer and more effective solutions that use compounds of plant origin to control diseases in fish.*

Keywords: Nanoprecipitation; sanity, tilapia, bacteriosis, essential oils.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os quatro maiores produtores mundiais de tilápia com forte tendência de crescimento da produção (MEDEIROS; ALBUQUERQUE, 2019). Um dos grandes desafios que podem comprometer a sustentabilidade da piscicultura é a ocorrência de doenças em peixes, as quais levam à redução do valor comercial, devido às lesões provocadas pelas infecções bacterianas e consequente aumento da mortalidade (HERNANDES 2016). Para contornar esse problema, diferentes antibióticos são utilizados. No entanto, o uso intensivo de antibióticos pode levar ao desenvolvimento de resistência pelas bactérias patogênicas, contaminar o meio ambiente e deixar resíduos nos alimentos (REGITANO; LEAL, 2010; TAVARES-DIAS; MARIANO, 2015). Assim, métodos alternativos e inovadores para o controle de doenças em peixes que sejam efetivos e ambientalmente seguros precisam ser implementados de forma a contribuir com a superação desses desafios da piscicultura (SOARES *et al.*, 2020).

A utilização de compostos naturais se mostra como uma alternativa favorável ao uso de antibióticos para controlar a proliferação de micro-organismos patogênicos, assim como para serem desenvolvidos no caso de resistência aos antibióticos (NOSTRO; PAPALIA, 2012). Óleos essenciais, são produtos naturais que consistem em combinações de inúmeras moléculas voláteis, geralmente compostos por monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides e outras substâncias com baixas massas moleculares (MARTINS, 2012). Eles têm sido usados para diversas aplicações farmacêuticas, cosméticas, agrícolas e em indústrias alimentícias (ASBAHANI *et al.*, 2015). No entanto, óleos essenciais são compostos voláteis instáveis e frágeis, conseqüentemente, podem ser degradados facilmente (por oxidação, volatilização, aquecimento ou luz) se não estiverem protegidos de fatores externos (ASBAHANI *et al.*, 2015).

Carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil)-fenol), cuja estrutura está mostrada na Figura 1, é pertencente ao grupo dos fenóis monoterpênicos, biossintetizado a partir de terpineno, por meio de *p*-cimeno. É encontrado em plantas aromáticas e em diversos óleos essenciais de plantas da família Labiatae, como por exemplo, os gêneros *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, *Thymus* e *Corydothymus*. Nos Estados Unidos e na Europa, foi aprovado como aditivo alimentar considerado seguro, sendo utilizado como agente aromatizante em doces, bebidas e goma de mascar (NOSTRO; PAPALIA, 2012).

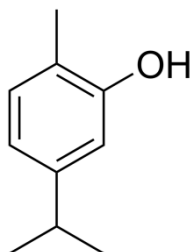


Figura 1. Estrutura química do carvacrol.

É descrito em várias pesquisas que o carvacrol apresenta uma alta diversidade de propriedades biológicas, tais como atividades anti-inflamatória, antioxidante, antimutagênica, antitumoral, analgésica, inseticida, antiparasitária e antimicrobiana (NOSTRO; PAPALIA, 2012). Estes estudos têm mostrado que a atividade antimicrobiana relaciona-se essencialmente com a interação que o carvacrol possui com as membranas celulares dos diversos micro-organismos (ALMEIDA, 2015). Segundo Helander *et al.* (1998 apud ALMEIDA, 2015, p. 4) em estudo com células de *Escherichia coli* e *Photobacterium leiognathi*, que são bactérias Gram negativas, após submeterem as células ao carvacrol, chegaram à conclusão de que este composto ocasiona a desintegração da membrana citoplasmática, devido à liberação de lipopolissacarídeos, redução dos níveis de ATP intracelular e aumento dos níveis de ATP extracelular. O estudo de Xu *et al.* (2008) atribuiu a atividade antibacteriana do carvacrol à capacidade deste de permeabilizar e despolarizar



a membrana citoplasmática de *E. coli*. Para testar esta hipótese, a equipe usou a coloração fluorescente combinada com a citometria de fluxo. Conforme os ensaios realizados, demonstrou-se a diminuição da taxa de fluorescência em razão das alterações provocadas sobre a permeabilidade da membrana, por causa da interação desta com o carvacrol.

Por meio da nanotecnologia é possível alterar algumas propriedades intrínsecas à molécula, tais como sua solubilidade em água, aumento da estabilidade e tempo de ação, proteção contra a degradação prematura, além de possibilitar a liberação sustentada dos ativos (ASBAHANI *et al.*, 2015).

Dentre os diferentes tipos de nanopartículas que podem ser utilizadas, as poliméricas têm sido aplicadas no desenvolvimento de nanocarreadores de diferentes compostos. (PASCOLI *et al.*, 2018; VURRO *et al.*, 2019). É considerada a forma mais simples de sistemas de liberação controlada, capazes de aumentar a eficiência e solubilidade dos compostos além de oferecer proteção aos compostos bioativos sujeitos à degradação prematura, atrelados aos benefícios de biodegradabilidade e biocompatibilidade (PASCOLI *et al.*, 2018).

Vários polímeros naturais e sintéticos, tais como poli- ϵ -caprolactona, quitosana e alginato de sódio têm sido utilizados no encapsulamento de diferentes compostos levando a formação de nanopartículas de diferentes tamanhos (NURUZZAMAN *et al.*, 2016). Buscando uma melhor interação entre as nanocápsulas e o tecido alvo, pesquisadores usam “coatings” superficiais nas nanopartículas dando uma carga catiônica (+) ou aniônica (-) ou até mesmo funcionalizando-as com moléculas específicas que se ligam a receptores celulares. Nanopartículas revestidas com quitosana têm despertado a mucosa. Estudos têm demonstrado que as propriedades mucoadesivas da quitosana ajudam a modelar a liberação sustentada dos ativos (BERNI-NETO, 2014).

Na aquicultura, a imersão é um dos principais métodos de administração de medicamentos ou imunomoduladores aos peixes. No entanto a eficiência destes está diretamente relacionada com a forma de exposição aos medicamentos e sua absorção pelo peixe, que é variável e dependente da dose aplicada. O uso de nanocarreadores mucoadesivos é uma alternativa promissora para administração de medicamentos e imunomoduladores em sistemas de imersão por aderirem à superfície mucosa do peixe resultando em pouco efeito residual na água (SILVA, *et al.*, 2018).

O objetivo deste trabalho foi preparar nanopartículas poliméricas carregadas com carvacrol utilizando o polímero biodegradável poly- ϵ -caprolactone (PCL) e o biopolímero natural com propriedades mucoadesivas quitosana, pelo método de nanoprecipitação e avaliar o efeito do encapsulamento na atividade antimicrobiana frente a bactéria *Streptococcus agalactiae*.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das nanopartículas poliméricas e determinação da eficiência de encapsulamento

Os experimentos para o preparo das nanopartículas contendo carvacrol foram realizados na Central Analítica de Resíduos e Contaminantes da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna – SP.

Para a obtenção dos sistemas, utilizou-se o método da nanoprecipitação descrito por Berni-Neto, (2014). Primeiramente, foram preparadas duas soluções, uma aquosa (ácido acético 0,2% (v/v), quitosana e Tween 80) e outra orgânica (acetona, PCL e carvacrol, no caso das nanopartículas carregadas) completamente miscíveis. Um volume de 3 mL da fase orgânica foi adicionado à solução aquosa (9 mL) via *drop wise* (gotejamento controlado e contínuo) a uma taxa de 0,5 mL/min sob agitação magnética (400 rpm). Manteve-se a agitação magnética por mais 15 minutos e submeteu-se à evaporação do solvente orgânico sob baixa pressão.

A eficiência de encapsulamento (ee%) foi calculada de forma indireta, através da diferença da massa de carvacrol adicionada na nanoformulação (m total experimental) e a massa presente na fase aquosa (m fase aquosa). A massa de carvacrol na fase aquosa foi obtida após a filtração de 500 μ L da nanoformulação em microfiltros Amicon® ultra-0.5 com corte molecular de 10 kDa, centrifugados à 14.000 rpm, 20°C durante 40 minutos. A quantificação do carvacrol foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando detecção por arranjo de diodos em comprimento de onda de 274 nm. O analito sofreu eluição em modo gradiente, iniciando em 50% metanol (grau HPLC) até 80% em 10 minutos, mantendo-se por mais 3 minutos e retornando ao equilíbrio inicial, totalizando 20 minutos de corrida, a coluna utilizada foi C18, 5 μ m, 250 x 4,6 mm (Phenomenex), fluxo 0,800 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 μ L. O tempo de retenção atribuído ao carvacrol foi de 9,6 minutos. Os ensaios de quantificação foram realizados por meio de padronização externa, utilizando-se uma curva analítica, na faixa de 2,5 a 40 μ g mL⁻¹. O ensaio foi realizado em triplicata.

2.2. Avaliação da atividade *in vitro* contra bactéria causadora de infecções em peixe

A atividade antimicrobiana de carvacrol isolado e na forma de nanopartícula foi avaliada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), por meio da técnica da microdiluição e pela determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), através da semeadura em placas de Petri (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003). A determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços, dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Em cada um dos poços das placas de microdiluição foram inseridos 100 μ L de caldo TSB. Em seguida, inseriu-se numa microplaca 100 μ L da substância pura



carvacrol e em outra microplaca carvacrol na forma de nanopartícula para obtenção da concentração inicial de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ na primeira linha da placa de microdiluição. As concentrações subsequentes foram obtidas após diluição seriada dos compostos na placa de microdiluição, partindo-se da concentração inicial de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (linha A) até $0,0078125 \text{ mg mL}^{-1}$ (linha H), pela transferência de $100\mu\text{L}$ do conteúdo ao poço subsequente. Para os poços da linha H, foram dispensados $100\mu\text{L}$ do conteúdo, de modo a igualar o volume total de cada poço. Posteriormente, foram inseridos $10 \mu\text{L}$ da suspensão dos micro-organismos ($1,5 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$) em todos os poços. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C , por 48 horas. A CIM correspondeu à última diluição dos óleos essenciais na qual não foi verificado o crescimento do micro-organismo pela adição de uma solução 0,5% de cloreto,2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC). A revelação de uma coloração vermelha na suspensão indicou que houve crescimento microbiano após o período de incubação. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi usada para saber qual a menor concentração da formulação capaz de inibir o crescimento bacteriano visível foi obtida por meio da semeadura, em Agar Mueller-Hinton, de alíquotas de $10\mu\text{L}$ das diluições correspondentes da CIM, o efeito bacteriostático foi determinado pela ausência de crescimento nos poços da placa de microdiluição. Após a semeadura, as placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C , por 24h. A CBM foi considerada a menor concentração que impediu o crescimento visível das bactérias ou permitiu a formação de até três Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Foi realizado controle positivo com adição de cloranfenicol mais *S. agalactiae* ao meio TSB e negativo com meio TSB mais a bactéria em estudo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia de preparo das nanopartículas pelo método da nanoprecipitação foi baseada na descrita por Berni-Neto (2014), substituindo-se PCL de peso molecular de $65.000 \text{ g mol}^{-1}$, utilizado pelo autor no encapsulamento da violaceína pelo de peso molecular médio de $10.000 \text{ g mol}^{-1}$. É bem estabelecido na literatura que fatores como a natureza do princípio ativo (hidrofobicidade/hidrofilicidade), propriedades físico-químicas do polímero (relacionados com seu peso molecular) e a estrutura das nanopartículas estão intimamente relacionadas com a liberação do ativo da nanopartícula. O método de nanoprecipitação utilizando-se um polímero hidrofóbico (PCL) resulta em elevada eficiência de encapsulamento de ativos insolúveis em água como o carvacrol (MELO, 2011). A opção da quitosana se deu pela sua propriedade de mucoadesão, devido à sua carga positiva proveniente dos agrupamentos amins presentes em sua molécula. Desta forma, a adição de quitosana na formulação pode proporcionar uma carga superficial positiva às nanopartículas, dando a estas propriedades de mucoadesão (SOSNIK *et al.*, 2015).

Carvacrol foi satisfatoriamente encapsulado nas nanopartículas de PCL e quitosana, resultando em eficiência de encapsulamento de $69,64 \pm 4,42\%$. Compostos apolares encapsulados pelo método de nanoprecipitação resultam em eficiência de encapsulamento maiores que 70% (MELO, 2011). São comparáveis com outros trabalhos que envolvem a nanoprecipitação como método de encapsulamento de ativos (COLA *et al.*, 2016; HAGGAG *et al.*, 2020; SHAABAN, SHAKER, MADY, 2017). CAMPOS *et al.* (2018) prepararam nanopartículas de quitosana funcionalizadas com ciclodextrina contendo carvacrol e linalol, utilizando o método de gelificação iônica, obtendo $93.9 \pm 0.58\%$ e $86.9 \pm 0.9\%$ de eficiência de encapsulamento para carvacrol e linalol respectivamente. Os autores atribuíram a alta eficiência de encapsulamento à hidrofobicidade destes compostos e à forte afinidade pelo núcleo hidrofóbico da nanopartícula ou à cavidade hidrofóbica da ciclodextrina presente neste sistema.

A Figura 2 apresenta os cromatogramas típicos do carvacrol pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD), utilizada para quantificar a eficiência de encapsulamento.

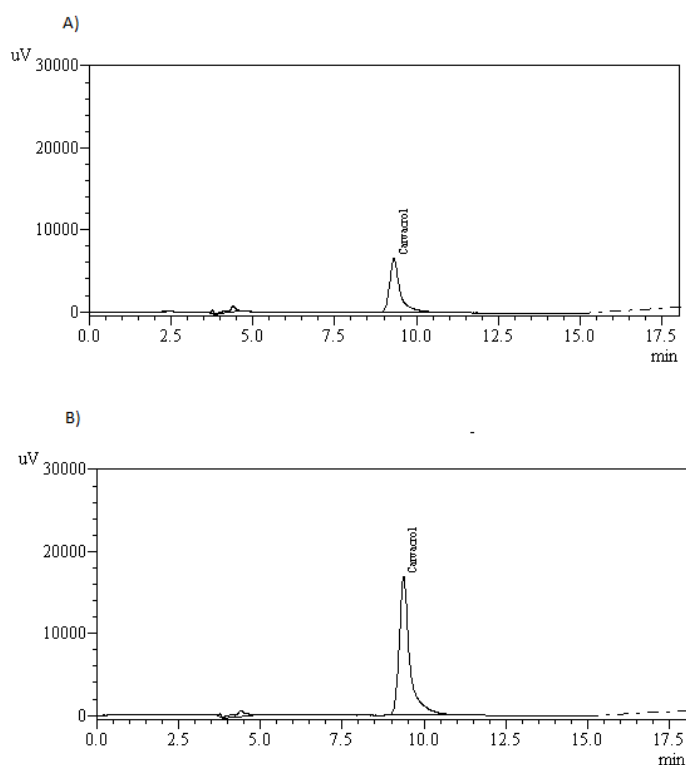


Figura 2. Cromatogramas típicos obtidos pela técnica de HPLC-DAD, utilizado para quantificar do carvacrol. A) amostra e B) padrão de carvacrol $20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O efeito do encapsulamento na atividade antimicrobiana do carvacrol frente à bactéria *Streptococcus agalactiae* foi avaliado. Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos testados contra *S. agalactiae* foram $390,625 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente para carvacrol isolado e para a forma de nanopartícula (Figura3).

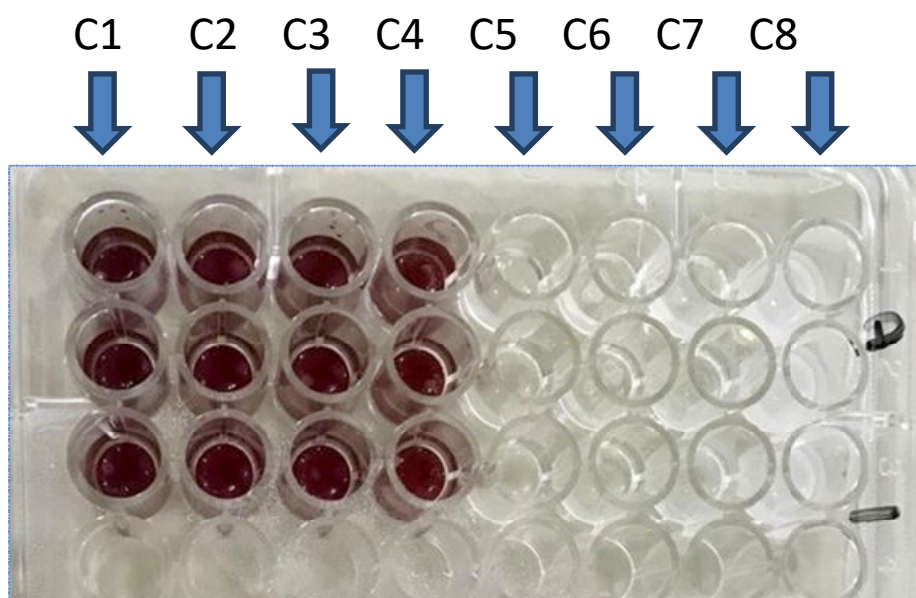


Figura 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) da nanopartícula contra *Streptococcus agalactiae*, onde $C1 = 0,0039 \text{ mg mL}^{-1}$; $C2 = 0,0078 \text{ mg mL}^{-1}$; $C3 = 0,0156 \text{ mg mL}^{-1}$; $C4 = 0,03125 \text{ mg mL}^{-1}$; $C5 = 0,0625 \text{ mg mL}^{-1}$; $C6 = 0,125 \text{ mg mL}^{-1}$; $C7 = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$; $C8 = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$.

Após observação do plaqueamento em placas de Agar Mueller-Hinton no teste do CBM, realizado em triplicata, observou-se que não houve crescimento da bactéria nas repetições, nas concentrações $390,625 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente para carvacrol isolado e para a forma de nanopartícula, confirmando portanto o efeito bactericida do composto isolado e na forma de nanopartícula.

Conforme a classificação descrita por Freires *et al.* (2015), a nanopartícula de quitosana com PCL, contendo o carvacrol, apresentou uma atividade muito forte, com um valor menor de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, já o carvacrol isolado apresentou uma atividade forte com um valor entre $101\text{-}500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A efetividade das nanopartículas pode ser explicada pela proteção do carvacrol contra sua rápida volatilização e degradação, além de ser liberado de forma sustentada das nanoestruturas.



O resultado alcançado mostrou-se promissor e a próxima etapa do trabalho será a realização de estudos *in vivo* a fim de avaliar a eficiência da nanopartícula e validar a tecnologia em tilápia infectada com *S. agalactiae*.

A presente pesquisa reforça que estudos adicionais devem ser realizados no âmbito da obtenção de nanopartículas a fim de alcançar um maior desenvolvimento desta área, de modo que a eficiência de encapsulamento de ativos seja sempre alta. Com isso, podem ser desenvolvidas novas tecnologias para controle de doenças causadoras de mortalidade e perda de produtividade na aquicultura. As vantagens desses novos materiais é a diminuição do uso de antibióticos comerciais, maior preservação ambiental e maior segurança quanto ao consumo deste alimento.

Os estudos realizados abrem perspectivas para soluções mais seguras e eficazes que empregam compostos de origem vegetal para o controle de doenças em peixe. A nanopartícula contendo carvacrol possui a vantagem de diminuir a volatilidade do princípio ativo, maior efeito residual por ser de liberação lenta e sofrer menor degradação por luz. Além disso, possui característica de mucoadesão, diminuindo a perda para o ambiente.

4. CONCLUSÃO

É possível sintetizar nanopartículas de quitosana com PCL apresentando alta eficiência de encapsulamento do carvacrol. A nanoprecipitação mostrou-se um método adequado para a síntese destas nanopartículas que resultaram num aumento da atividade antimicrobiana do carvacrol frente à bactéria *S. agalactiae*.

5. AGRADECIMENTOS

Parceria celebrada entre o BNDES, FEA e Embrapa, com aporte de recursos do BNDES, SAP/MAPA, contrapartida da Embrapa e apoio do CNPq. Projeto BRS Aqua (01.17.02.001.03.08).

6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. R. **Mecanismos de Ação dos Monoterpenos Aromáticos: Timol e Carvacrol**. 2015. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei. Disponível em: <https://www.ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/coqui/TCC/Monografia-TCC-Regiamara_R_Almeida-20151.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2020.

ANUÁRIO PEIXE BR DA PISCICULTURA. **Produção brasileira cresce 4,5% e atinge 722.560 t**. Pinheiros: Peixe BR, 2019. Associação Brasileira da Piscicultura. Anual.

ASBAHANI, A. El. et al. **Essential oils: from extraction to encapsulation**. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 220-243, 10 Apr. 2015.



BERNI-NETO, E. A. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo amitraz, fluazuron e/ou violaceína para o uso na pecuária**. 2014. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CAMPOS, E. V. R. *et al.* Carvacrol and Linalool Co-loaded in β -Cyclodextrin-Grafted Chitosan Nanoparticles as Sustainable Biopesticide Aiming Pest Control. **Nature Research Journal**, v. 8, 7623.

COLA, D. F. *et al.* Sistemas Carreadores Lipídicos Nanoestruturados para Ivermectina e Metopreno Visando Controle de Parasitas. **Química Nova**, v. 9, n. 9, nov. 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422016000901034&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 16 ago. 2020.

FREIRES, I. *et al.* Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. **Molecules**, v. 20, p. 7329-7358, 22 Apr. 2015.

HAGGAG, Y. *et al.* Nanoencapsulation of Sophorolipids in PEGylated poly(lactide-co-glycolide) as a Novel Approach to Target Colon Carcinoma in the Murine Model. **Drug Delivery and Translation Research**, v. 10, p. 1353-1366. 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13346-020-00750-3#citeas>>. Acesso em: 15 ago. 2020.

HERNANDES, L. M. *et al.* Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil – uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 1, p. 44-59, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/318320460_PRINCIPAIS_INFECCOES_BACTERIANAS_NA_CRIACAO_DE_PEIXES_DE_AGUA_DOCE_DO_BRASIL_-_UMA_REVISAO>. Acesso em: 16 ago. 2020.

MARTINS, C. M. **Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (Pau-Santo) do Cerrado**. 2012, 117 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

MEDEIROS, F. ALBUQUERQUE, A. (Coord.). **Anuários peixe br da piscicultura: produção brasileira cresce 4,5% e atinge 722.560 t**. São Paulo: Peixe BR Associação Brasileira da Piscicultura. Anual. 2019.

MELO, N. F. S. de. **Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas como sistema carreador para liberação modificada do anestésico local benzocaína**. 2011. 152 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically Approved standard M7-A6. Wayne, PA: NCCLS, 2003.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 7, p. 28-35, 2012.

NURUZZAMAN, Md. *et al.* Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: a new window for safe application. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 1447-1483, 24 Feb. 2016. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.5b05214>>. Acesso em: 21 jul. 2020.

PASCOLI, M. *et al.* State of the art of polymeric nanoparticles as carrier systems with agricultural applications: a minireview. **Energy, Ecology & Environment**, v. 3, p. 137-148, Jun. 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s40974-018-0090-2>>. Acesso em: 21 jul. 2020.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e Impacto Ambiental de Antibióticos Usados na Produção Animal Brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 3, p. 601-616, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/rbcs/v34n3/02.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2020.

SHAABAN, M. I.; SHAKER, M. A.; MADY, F. M. Imipenem/ cilastatin encapsulated polymeric nanoparticles for destroying carbapenem-resistant bacterial isolates. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, 11 Apr.



2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/s12951-017-0262-9>>. Acesso em: 16 ago. 2020.

SILVA, I.C. *et al.* Nanoparticle mucoadhesive system as a new tool for fish immune system modulation. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 80, p. 651-654, 2018.

SOARES, M. P. *et al.* Effects of artemisia annua alcohol extract on physiological and innate immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to improve health status. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 105, p. 369-377, 2020.

SOSNIK, A.; RASKIN, M. M. Polymeric micelles in mucosal drug delivery: challenges towards clinical translation. **Biotechnology Advances**, v. 33, part 3, p. 1380-1392, 01 Nov. 2015.

TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W. dos S. Aquicultura no Brasil: novas perspectivas, São Carlos: Pedro & João Editores, 2015. 429 p., v. 1 – Aspectos Biológicos, Fisiológicos e Sanitários de Organismos Aquáticos. Disponível em: <https://vet.ufmg.br/ARQUIVOS/FCK/file/LIVRO%20PRONTO_VOLUME%20I%20-%20aquicultura%20no%20Brasil.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2020.

VURRO, M.; MIGUEL-ROJAS, C; PÉREZ-DE-LUQUE, A. Safe nanotechnologies for increasing the effectiveness of environmentally friendly natural agrochemicals. **Pest Management Science**, v. 75, 2019, p. 2403-2412, 22 Jan. 2019.

XU, J. *et al.* The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, 27 Aug. 2008. Disponível em: <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x>>. Acesso em: 16 ago. 2020.