



AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE NANOFORMULAÇÕES EM MICROCRUSTÁCEO BIOINDICADOR PARA USO NA PISCICULTURA

Beatriz Cristine Fariano **Mendes**¹, Julia Marrote **Ferreira**², Claudio Martin **Jonsson**³, Márcia Regina **Assalin**⁴, Sonia Claudia do Nascimento de **Queiroz**⁵

Nº22401

RESUMO – Embora a piscicultura no Brasil se destaque como uma área com grande relevância econômica, a ocorrência de diversas patologias vem causando muitos impactos negativos na saúde dos peixes e na produtividade. As soluções convencionais como o uso de antibióticos é um fator preocupante devido aos impactos ambientais causados nos ecossistemas aquáticos e terrestres, além da saúde humana. Diante disso, se faz necessário a busca de alternativas que sejam menos prejudiciais aos organismos que fazem parte desses ecossistemas. O presente trabalho relata os resultados obtidos a partir de testes de toxicidade aguda de amostras de duas nanoformulações de zeína (uma das proteínas derivadas do milho), uma com carvacrol e outra com óleo essencial de *Piper aduncum*, além do branco da nanoformulação (isento dos princípios ativos). De modo a verificar a viabilidade do uso seguro de nanoformulações na piscicultura foram realizados bioensaios com concentrações estipuladas para avaliar a imobilidade no microcrustáceo, *Daphnia magna*, que é considerado um excelente bioindicador. Os testes foram feitos em placas com 12 poços contendo 5mL de soluções teste, com um total de 24 organismos em cada placa. Como resultado, observou-se que a toxicidade da nanoformulação contendo carvacrol, diminuiu significativamente quando comparada com a emulsão de carvacrol, a qual, em ensaios prévios, foi considerada extremamente tóxica para os organismos testes. Além disso, observou-se diferença significativa da emulsão de *Piper aduncum* com as nanopartículas de zeína com *P. aduncum*, porém a toxicidade foi diminuída poucas vezes.

Palavras-chave: Nanoformulações, *Daphnia magna*, toxicidade, patologias.

1. Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP; bcfariano@gmail.com.

2. Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Química, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Campinas-SP;

3. Colaborador, Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, Doutor em Biologia Funcional e Molecular - Bioquímica.

4. Colaboradora, Analista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, Dra em Química

5. Orientadora, Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, Dra em Química Analítica,

sonia.queiroz@embrapa.br.



ABSTRACT - Although fish farming in Brazil stands out as an area with a great economy, the occurrence of several diseases causing many impacts on fish health and productivity. Conventional solutions such as the use of antibiotics is a worrying factor due to the environmental impacts caused on aquatic and terrestrial ecosystems, in addition to human health. Therefore, it is necessary to search for alternatives that are less harmful to the organisms that are part of these ecosystems. The present work reports the results obtained from acute toxicity tests of samples of two zein nanoformulations (one of the proteins derived from corn), one with carvacrol and another with *Piper aduncum* essential oil, in addition to the blank of the nanoformulation (free from active ingredients). In order to verify the feasibility of the safe use of nanoformulations in fish farming, bioassays with stipulated concentrations were carried out to evaluate the immobility in the microcrustacean, *Daphnia magna*, which is considered an excellent bioindicator. Tests were performed in 12-well plates containing 5mL of test solutions, with a total of 24 organisms on each plate. As a result, it was observed that the toxicity of the nanoformulation containing carvacrol significantly decreased when compared to the carvacrol emulsion, which, in previous tests, was considered extremely toxic to the test organisms. In addition, there was a significant difference between the *Piper aduncum* emulsion and the zein nanoparticles with *P. aduncum*, but the toxicity was reduced a few times.

Keywords: Nanoformulations, *Daphnia magna*, toxicity, pathologies.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a piscicultura tem se destacado como uma atividade importante em função do seu potencial econômico e de lazer. Segundo Nascimento *et al.* (2021) assim como em qualquer outro sistema de produção intensivo, os peixes destinados à piscicultura estão vulneráveis a diversas patologias devido a fatores como alta densidade populacional, estresse, baixa qualidade de água, como por exemplo, excesso de amônia, variações bruscas na temperatura da água, entre outros.

Para mitigar os problemas causados por patógenos, é muito comum recorrer ao uso de antibióticos. Segundo a Fundação Oswaldo Cruz (2017), os antibióticos são medicamentos desenvolvidos a partir de bactérias, fungos ou formulações sintéticas com a função de combater microrganismos responsáveis por infecções. Atualmente apenas dois antimicrobianos são aprovados para uso na aquicultura no Brasil, a oxitetraciclina e o florfenicol (SINDAN, 2018). O uso de



antibióticos auxilia no controle da proliferação das bactérias patogênicas nas áreas de cultivo, com isso, os peixes ficam menos suscetíveis a doenças e proporcionam um aumento da produtividade.

Os antibióticos são extremamente eficientes às funções designadas, contudo, quando são analisados os impactos causados no meio ambiente o cenário muda. Por exemplo, na aquicultura algumas modalidades de criação são feitas em ambientes abertos, e o uso combinado de antimicrobianos causa a contaminação dos cursos d'água, e por consequência favorece a seleção, e disseminação de patógenos resistentes aos medicamentos, representando uma importante ameaça à saúde pública (REVERTER *et al.*, 2020)

As práticas para redução de impacto ambiental na agricultura e, também, em diversos outros setores vem ganhando cada vez mais espaço no mercado nacional, a partir da adoção de novas tecnologias e metodologias, como por exemplo, as boas práticas de manejo, novas regulamentações, substituição de substâncias nocivas, dentre outras.

Recentemente, tem ocorrido um avanço na área de estudos de potenciais bioativos extraídos de plantas, principalmente, os que são provenientes de óleos essenciais, para serem utilizados no tratamento de doenças em peixes. Entretanto, para viabilizar o uso dessas substâncias, novas pesquisas envolvendo o uso de nanotecnologia têm sido avaliadas para proteção dessas substâncias bioativas da degradação e possíveis perdas por evaporação. Além disso, a liberação gradual dos compostos do óleo aumenta seu poder de ação (GONZÁLEZ *et al.*, 2014).

As nanoformulações também promovem uma maior área específica, solubilidade e mobilidade de partículas, o que por consequência favorece uma atuação mais eficiente desses óleos quando comparados às práticas convencionais como o uso de emulsões.

O carvacrol (Figura 1), é o principal componente ativo nas plantas pertencentes à família Lamiaceae, como orégano, tomilho, entre outras. Possui alto potencial de uso na aquicultura para controle de microorganismos como *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus iniae* (NING *et al.*, 2021).

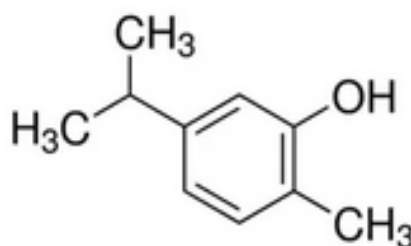


Figura 1. Fórmula estrutural do Carvacrol.



O dilapiol (Figura 2), é o principal constituinte ativo da pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*), também pode ser encontrado em endros e raízes de erva doce. Esse constituinte é responsável pelo controle de *Hysterothylacium sp.*, um endoparasita responsável por significativas perdas nas criações de várias espécies de peixes (CORRAL *et al.*, 2018).

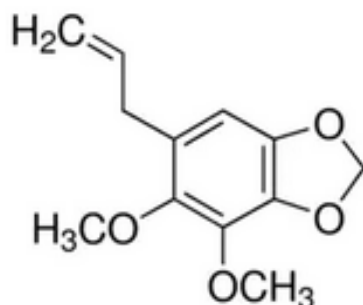


Figura 2. Fórmula estrutural do Dilapiol.

As nanopartículas de zeína são constituídas por proteínas presentes no milho (*Zea mays*) que favorecem a solubilidade dos óleos essenciais em mais de dez vezes, fato que não faz com que ela perca uma característica muito importante, que é de ser antioxidante. Um exemplo do seu uso foi descrito por Abdelsalam *et al.* (2021) onde a quebra de nanopartículas contendo os compostos fenólicos, timol e carvacrol, liberados lentamente, ocasionaram a redução da proliferação de *Escherichia coli*, um patógeno causador de doenças na criação de peixes.

O uso do microcrustáceo de água doce *Daphnia magna* (Figura 3), em bioensaios, é corroborado devido à sua alta disponibilidade anual, baixo custo de criação, alta taxa de reprodução e ocorrência universal, formando um elo muito importante para a cadeia alimentar. Além disso, há geralmente uma maior sensibilidade de *D. magna* para testes de curta e longa duração quando comparada aos demais invertebrados aquáticos e peixes (ADEMA, 1978). A *D. magna* é altamente sensível em baixas concentrações de produtos químicos, nesses tipos de testes, é um notório bioindicador da qualidade do ambiente aquático.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade de nanoformulações contendo carvacrol e óleo de *Piper aduncum* através da observação da imobilidade da *D. magna* frente a diferentes concentrações destes nanomateriais. Os dados obtidos poderão auxiliar no estabelecimento de padrões de qualidade da água e normas de manejo desses nanomateriais na piscicultura de modo a proteger prováveis impactos nas comunidades aquáticas.



Figura 3. Neonato de *Daphnia magna*. Fonte <Arman *et al.* (2016)>

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Teste

Para a realização dos testes ecotoxicológicos foram utilizadas duas nanoformulações de zeína, uma contendo carvacrol (princípio ativo) e outra contendo o óleo essencial de *Piper aduncum*, bem como o branco da nanoformulação (isento dos princípios ativos). Em trabalhos anteriores foram avaliadas atividades ecotoxicológicas das emulsões de carvacrol (dados não publicados) e *Piper aduncum* (MIURA *et al.*, 2021), obtidas utilizando Tween 80 (1 g/ L^{-1}). Nanopartículas de zeína foram preparadas pelo método de precipitação anti solvente. A concentração final de carvacrol e *Piper aduncum* nas soluções teste das nanoformulações foi de 5 mg/mL.

2.2 Organismo Teste

Espécimes de Daphnia magna foram cultivadas em 4 aquários de dimensões iguais a 40 x 25 x 15 cm, com água reconstituída formada por solução 1 (Cloreto de cálcio dihidratado e água bidestilada ou de osmose reversa), solução 2 (Cloreto de potássio, sulfato de magnésio heptahidratado, bicarbonato de sódio e água destilada ou de osmose reversa), solução A (EDTA dissódico dihidratado, sulfato ferroso, ácido bórico, cloreto de manganês tetrahidratado, cloreto de estrôncio hexahidratado, brometo de potássio, molibdato de amônio tetrahidratado, sulfato de cobre pentahidratado, sulfato de zinco heptahidratado, cloreto de cobalto hexahidratado, iodeto de potássio, selenito de sódio e água bidestilada ou de osmose reversa), solução C (Silicato de sódio, nitrato de sódio, fosfato de potássio monobásico ou dihidrogenofosfato de potássio fosfato de potássio dibásico ou monohidrogenofosfato de potássio e água bidestilada ou de osmose reversa) e solução D (Tiamina, biotina e água bidestilada ou de osmose reversa) (JONSSON; MAIA, 1999), com características físico-químicas de pH 7,6, condutividade $0,37 \text{ ms.cm}^{-1}$ e dureza total 111,2 mg de



$\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. A água reconstituída foi trocada nos aquários duas vezes por semana. Os pequenos crustáceos foram mantidos em sala climatizada sob temperatura controlada a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, luminosidade de ~ 1000 luz, com alimentação diária de microalgas da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata*. Para realização desses testes foram utilizados os indivíduos com tempo de vida inferior a 24 horas, denominados neonatos.

2.3 Delineamento Experimental

Os testes foram realizados em placas de poliestireno contendo 12 poços por placa, com dois neonatos de *D. magna*, totalizando 24 organismos por concentração-teste. Os neonatos foram retirados dos aquários (com água reconstituída, específica e já estabelecida à criação desses organismos) e inseridos nos poços. As placas foram preparadas contendo as concentrações avaliadas para cada amostra, com um volume final de 5 mL de solução-teste (amostras) e o controle.

Ensaio preliminares foram realizados previamente nas concentrações de 100, 10, 1, 0,1 e 0,01 mg/L dos materiais-teste de modo a selecionar a faixa a ser usada nos testes definitivos. Os microcrustáceos foram submetidos às condições mencionadas previamente de luminosidade e temperatura, e foram alimentados somente antes da realização do experimento. Com o uso de um equipamento de contagem de colônias, a imobilidade foi registrada visualmente a cada 24h durante um período de 48h (CASTRO *et al.*, 2018).

2.4 Análise de dados

A concentração efetiva média (\pm intervalo de confiança 95%), ou seja, a que provocou 50% de imobilidade na população durante o período do teste (CE50-48h), foi determinada através do módulo Probit Analysis contido no programa the Statgraphics Centurion XVII version 1.17.04 (STATGRAPHICS19 CENTURION, 2022). Diferenças significativas entre os valores de CE50-96h foram consideradas ($p < 0,05$) quando os intervalos de confiança não se sobrepõem (BEJGARN *et al.*, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados da Tabela 1, foi possível demonstrar que o branco das nanopartículas de zeína se comportou como “praticamente não tóxico”, e que o valor de CE50-48h foi superior a 100 mg/L. O carvacrol, ou 2-metil-5-1-metiletilfenol, é um monoterpeneo que possui vasta gama de bioatividades úteis como atividades antimicrobianas, antioxidantes e anticancerígenas. Acredita-se que a atividade se dá em função da ruptura da membrana das



bactérias. Além disso, possui eficiência em tratamentos de fungos e inibe a produção de biofilmes (SHARIFI-RAD *et al.*, 2018).

Na piscicultura, as dietas enriquecidas com carvacrol reduzem a mortalidade relacionada a doenças bacterianas, proporcionando assim maiores taxas de sobrevivência em peixes. Por isso, é um complemento fundamental para a produção aquícola (SILVA *et al.*, 2021).

A ordem de toxicidade para o organismo testado foi da mais tóxica para a menos tóxica na seguinte ordem: emulsão carvacrol, emulsão *P. aduncum*, nanopartículas de zeína com carvacrol, e nanopartículas de zeína com *P. aduncum*. Pode-se notar que a emulsão de carvacrol demonstrou ser extremamente tóxica para *D. magna* segundo a classificação da (EPA, 2022), entretanto a sua toxicidade foi aproximadamente 4.600 vezes menor quando o composto foi encapsulado em nanopartículas de zeína.

Tabela 1. Imobilidade de *Daphnia magna* frente às emulsões e nanoformulações de carvacrol e óleo de *Piper aduncum*.

Amostra	CE50* 24h mg/L	CE50 48h mg/L
Emulsão carvacrol	0,0020 (0,0017 - 0,0023)	0,0018 (0,0015 - 0,0021)
Emulsão <i>P. aduncum</i>	13,4475 (11,3873 - 16, 5746)	6,8002 (5,7733 - 8,2902)
Branco nanopartículas de zeína	> 100	> 100
Nanopartículas de zeína com carvacrol	12,4848 (10,6347 - 15,0463)	8,2933 (6,8917 - 10,1991)
Nanopartículas de zeína com <i>P. aduncum</i>	12,1944 (10,1468 - 16,5285)	10,7862 (8,6075 - 15,1713)

*CE50 é a concentração efetiva média, com intervalo de confiança 95%, entre parênteses, para os períodos de 24 e 48 horas.

Piper aduncum é uma planta nativa da região amazônica que se destaca por sua ampla ação terapêutica, contra fungos, dores de estômago, reumatismo, febre e infecção. Por isso, o seu uso vem sendo estudado na piscicultura. Além disso, a emulsão de *P. aduncum* foi obtida através de estudos anteriores (MIURA *et al.*, 2021).

Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de CE50-48h da emulsão *P. aduncum* e sua formulação em nanopartículas de *P. aduncum* (zeína) porém a toxicidade do ativo foi diminuída, somente, em aproximadamente, 1,6 vezes. Sugere-se que essa redução de toxicidade seja devido à nanoformulação liberar de forma gradual os compostos ativos presentes.



4. CONCLUSÃO

Foi constatada não toxicidade das nanopartículas de zeína, podendo ser este nanomaterial utilizado como veículo no encapsulamento dos compostos bioativos estudados, assim como, em futuros estudos com *D. magna* como organismo-teste. A toxicidade do carvacrol foi altamente reduzida quando este composto se encontra na forma nanoencapsulada, sendo assim uma estratégia interessante relacionada ao potencial de uso na piscicultura para a redução de efeitos adversos em organismos não-alvo.

Ambas nanoformulações estudadas podem ser consideradas de uso promissor na piscicultura visto que demonstraram ser moderadamente a levemente tóxicas. Os resultados do presente estudo são úteis para delinear estudos a um maior prazo de exposição com *D. magna*, assim como, para integrar com dados de ensaios realizados com outros bioindicadores. Isto contribuiria para o estabelecimento de concentrações seguras em sistemas intensivos para a produção de peixes e de suas regiões de entorno.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa concedida, ao Sr. Rodrigo Castanha, técnico do laboratório do LEB por todo o suporte e preparo durante os experimentos e à bolsista PIBIC Rafaela Dionísio, por todo o apoio durante os testes realizados. Os autores também agradecem ao projeto BRS Aqua (11.17.02.001.03.08), parceria celebrada entre o BNDES e a Embrapa, com aporte de recursos do BNDES, SAP/MAPA e Embrapa.

6. REFERÊNCIAS

- ABDELSALAM, A. M. *et al.* Surface-tailored zein nanoparticles: strategies and applications. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 1354, 28 ago. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13091354>.
- ADEMA, D. M. M. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. **Hydrobiologia**, v. 59, n. 2, p. 125-134, jun. 1978. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00020773>.
- ARMAN, S.; AKAT, E.; ÜÇÜNCÜ, S. I. An investigation on some toxic effects of carbofuran on *daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). **Hacettepe Journal of Biology and Chemistry**, v. 2, n. 44, p. 155-160, 1 abr. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.15671/hjbc.20164418123>.
- BEJGARN, S. *et al.* Toxicity of leachate from weathering plastics: an exploratory screening study with *nitocra spinipes*. **Chemosphere**, v. 132, p. 114-119, ago. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.010>.



CASTRO, V. L. *et al.* Nanoecotoxicity assessment of graphene oxide and its relationship with humic acid. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 7, p. 1998-2012, 4 jun. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.4145>.

CORRAL, A. C. T. *et al.* Control of *Hysterothylacium* sp. (Nematoda: anisakidae) in juvenile pirarucu (*arapaima gigas*) by the oral application of essential oil of *piper aduncum*. **Aquaculture**, [S.L.], v. 494, p. 37-44, set. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.062>.

EPA. **Technical overview of ecological risk assessment**: analysis phase: ecological effects characterization. 2022. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0>. Acesso em: 02 jun. 2022.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Canal Saúde Construindo Cidadania. **Antibióticos**: uso responsável. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2017. Disponível em: <https://www.canalsaude.fiocruz.br/canal/videoAberto/antibioticos-uso-responsavel-les-1920>. Acesso em: 02 jun. 2022.

GONZÁLEZ, J. O. W. *et al.* Essential oils nanoformulations for stored-product pest control: characterization and biological properties. **Chemosphere**, v. 100, p. 130-138, abr. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.056>.

JONSSON, C. M.; MAIA, A. de H. N. **Protocolo**: avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas: uma proposta para os órgãos federais registrantes: testes toxicopatológicos em organismos não-alvo do ambiente aquático: organismos zooplancônicos, fitoplanctônicos e vertebrados. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 33 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 11).

MIURA, P. T. *et al.* Ecological risk assessment of *Piper aduncum* essential oil in non-target organisms. **Acta Amazonica**, v. 51, n. 1, p. 71-78, mar. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392202002691>.

NASCIMENTO, I. *et al.* Patógenos em peixes de ambientes naturais e de cultivo no Estado do Maranhão: um panorama e perspectivas de pesquisa. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 7, e15910716284, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16284>.

NING, L. *et al.* The benefits of blend essential oil for GIFT tilapia on the digestion, antioxidant, and muscle quality during cold storage. **Aquaculture**, v. 533, p. 736097, fev. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736097>.

REVERTER, M. *et al.* Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-1, 20 abr. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15735-6>.

SHARIFI-RAD, M. *et al.* Carvacrol and human health: a comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1675-1687, 9 maio 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6103>.

SINDAN SAÚDE ANIMAL. **Compêndio de produtos veterinários**. SINDAN 2018. Disponível em: https://sindan.org.br/noticias/page/2/?et_blog. Acesso em: 02 jun. 2022.

SILVA, J. M.; PAZ, A. L.; VAL, A. L. Effect of carvacrol on the haemato-immunological parameters, growth and resistance of *Colossoma macropomum* (Characiformes: serrasalmidae) infected by *aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 7, p. 3291-3300, 6 mar. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/are.15174>.

STATGRAPHICS19 CENTURION. **Statgraphics centurion XVII (Version 17.1.04)**. [S.l.]: Statgraphics Technologies, Inc, [s.d.]. Disponível em: <https://www.statgraphics.com/download-statgraphics-centurion-xvii>. Acesso em: 02 jun. 2022.