

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento e avaliação de nanomedicamento para prevenção de coccidiose
em frangos de corte

LANA FLÁVIA BARON

PORTO ALEGRE – RS, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento e avaliação de nanomedicamento para prevenção de coccidiose
em frangos de corte

Dissertação de mestrado apresentada por **Lana
Flávia Baron** ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Karina Paese

PORTO ALEGRE – RS, 2021

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 13.10.2021, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Renata Vidor Contri
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Sabrina Castilho Duarte
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Suínos e Aves

Baron, Lana Flávia
Desenvolvimento e avaliação de nanomedicamento para
prevenção de coccidiose em frangos de corte / Lana
Flávia Baron. -- 2021.
129 f.
Orientadora: Karina Paese.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2021.

1. Coccidiose aviária. 2. Eimeria spp.. 3.
toltrazuril. 4. nanocápsulas poliméricas. I. Paese,
Karina, orient. II. Título.

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho e a FAPERGS que financiou o desenvolvimento do projeto. Os experimentos realizados na presente dissertação foram conduzidos no Laboratório 405 (FacFar-UFRGS) e no Laboratório de Sanidade e Genética animal (EMBRAPA Suínos e Aves).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família. Especialmente, minha mãe e meu pai, que juntos enfrentaram tantas dificuldades para que eu pudesse estudar. A minha irmã e minha vó, obrigada pelo apoio e torcida.

Agradeço aos professores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelos ensinamentos e por possibilitarem o desenvolvimento do meu projeto. Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, e o laboratório 405 de nanotecnologia por todo o apoio. Em especial aos colegas Aline, Luiza, Juliana, Mari Brunetto, Thayse, Mari Ubatuba, Rafaela Gazzi, Andrey, Grazi, Danieli, Maiara, Rodrigo, Rafaela Oliveira, Manuela e Schaiane (laboratório PK/PD) por todo o apoio e paciência todos os dias no laboratório. Sou imensamente grata a minha amiga e colaboradora Gabryelle por todos os conselhos, conversas e experimentos juntas.

Sou grata principalmente a minha orientadora professora Dra. Karina Paese, que foi minha orientadora mais atenciosa. Agradeço pelo aprendizado, paciência, respeito, confiança e incentivo na realização desta pesquisa.

Agradeço à EMBRAPA Suínos e Aves pela oportunidade de realizar em parceria esta pesquisa. Assim, sendo possível agregar mais conhecimento e enriquecer minha pesquisa com os experimentos *in vitro* e *in vivo*. Obrigada Ana, Franciana, Shai, Gaby e Rovian pela ajuda e pelos conhecimentos repassados. Agradeço em especial ao Noé, idealizador deste estudo e meu mentor desde meu primeiro dia na pesquisa, obrigada por toda paciência, apoio e dedicação em minha formação.

Meu eterno agradecimento a todos os meus amigos e colegas, que deram uma contribuição valiosa para a minha jornada acadêmica. Obrigada pelos conselhos, palavras de apoio, puxões de orelha e risadas. Agradeço também ao meu amor e amigo Edilson, que ao longo desses anos me deu não só força, mas apoio para vencer essa etapa da vida. Obrigada por suportar as crises de estresse e minha ausência em diversos momentos.

Por fim, agradeço a Deus, que foi minha maior força nos momentos de angústia e desespero. Sem ele, nada disso seria possível. Obrigada Senhor, por colocar esperança, amor e fé no meu coração.

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação de mestrado está dividida em dois capítulos, objetivando a melhor organização dos dados obtidos ao longo do desenvolvimento do estudo. Segue abaixo a divisão pontual deste trabalho.

- Introdução;
- Objetivos;
- Capítulo I: Proposição de artigo de revisão de literatura intitulado: “Diagnóstico e terapias veterinárias desenvolvidas utilizando nanotecnologia”;
- Capítulo II: Revisão, Metodologias e Resultados acerca da parte experimental desenvolvida ao longo do mestrado acadêmico;
- Conclusões;
- Referências bibliográficas.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 23 |
| 2 OBJETIVOS | 25 |
| 2.1 Objetivo geral | 25 |
| 2.2 Objetivos específicos | 25 |
| CAPÍTULO I: Proposição de artigo de revisão de literatura intitulado: “EMPREGO DA NANOTECNOLOGIA EM TERAPIAS VETERINÁRIAS” | 26 |
| CAPÍTULO II: Revisão, Metodologias, Resultados e Discussão acerca da parte experimental desenvolvida ao longo do mestrado acadêmico. | 60 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 62 |
| 3.1 Coccidiose aviária | 63 |
| 3.2 Ciclo de reprodução da <i>Eimeria spp.</i> | 63 |
| 3.3 Sintomas causados pela coccidiose..... | 65 |
| 3.4 Profilaxia e tratamento da coccidiose | 65 |
| 3.5 Toltrazuril..... | 67 |
| 3.6 Nanotecnologia aplicada a terapêutica | 68 |
| 3.7 Polímeros biocompatíveis | 69 |
| 3.7.1 Poli- ϵ -caprolactona | 69 |
| 3.7.2 Eudragit® S100 | 69 |
| 3.8 Nanotecnologia empregada no tratamento de frangos de corte..... | 70 |
| 4 METODOLOGIA..... | 73 |
| 4.1 Materiais..... | 73 |
| 4.1.1 Matérias-primas..... | 73 |
| 4.1.2 Aparelhos e equipamentos..... | 73 |
| 4.1.3 Solventes e outros materiais | 73 |
| 4.2 Preparação de nanocápsulas poliméricas contendo toltrazuril..... | 74 |
| 4.3 Caracterização físico-química das formulações desenvolvidas | 75 |
| 4.3.1 Determinação da distribuição granulométrica e do D[4,3]..... | 75 |
| 4.3.2 Determinação do diâmetro médio de partícula (z-average) e do índice de polidispersão (PDI)..... | 75 |
| 4.3.3 Determinação do pH | 75 |
| 4.3.4. Determinação do potencial zeta | 76 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.3.5 | Quantificação do toltrazuril | 76 |
| 4.3.6 | Determinação da eficiência de associação | 77 |
| 4.3.7 | Avaliação morfológica | 78 |
| 4.3.8 | Análise reológica das formulações | 78 |
| 4.4 | Determinação da estabilidade química e física das formulações contendo o fármaco toltrazuril | 78 |
| 4.4.1 | Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)..... | 78 |
| 4.4.2 | Microscopia de luz polarizada | 79 |
| 4.4.3 | Estabilidade de teor de toltrazuril das nanoformulações (LNCt e NC _{s100t}) | 79 |
| 4.5 | Estabilidade das formulações em meio gastrointestinal simulado..... | 79 |
| 4.6 | Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos aviários tratados com nanocápsulas poliméricas contendo toltrazuril | 80 |
| 4.6.1 | Cultivo celular..... | 80 |
| 4.6.2 | Avaliação da viabilidade celular utilizando o kit <i>LIVE/DEAD</i> [®] <i>Viability/Cytotoxicity</i> | 80 |
| 4.6.3 | Avaliação da viabilidade celular utilizando o kit <i>APO-DIRECT</i> [®] <i>Apoptosis detection</i> | 81 |
| 4.7 | Avaliação <i>in vivo</i> da eficácia da formulação LNCt..... | 82 |
| 4.7.1 | Animais utilizados e desenho experimental..... | 82 |
| 4.7.2 | Tratamentos | 82 |
| 4.7.3 | Análise histológica..... | 83 |
| 4.7.4 | Análise de morfometria..... | 84 |
| 4.8 | Aspectos Éticos..... | 84 |
| 4.9 | Gerenciamento De Resíduos Químicos e Biológicos | 84 |
| 4.10 | Análise estatística | 85 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 86 |
| 5.1 | Caracterização físico-química das formulações desenvolvidas | 86 |
| 5.2 | Determinação da presença de nanocristais nas formulações contendo o fármaco toltrazuril..... | 93 |
| 5.2.1 | Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)..... | 93 |
| 5.2.2 | Análise de microscopia de luz polarizada..... | 94 |
| 5.2.3 | Estabilidade do teor das nanoformulações contendo toltrazuril | 95 |
| 5.3 | Estabilidade físico-química das formulações LNCt e NC _{s100t} expostas ao meio gastrointestinal simulado | 97 |

| | |
|--|-----|
| 5.4 Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos aviários expostos a nanocápsulas poliméricas contendo toltrazuril | 98 |
| 5.5 Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> da formulação LNCt..... | 103 |
| 5.5.1 Integridade das nanocápsulas após a diluição prévia em água para o tratamento | 103 |
| 5.5.2 Consumo de ração e peso dos animais | 104 |
| 5.5.3 Avaliação macroscópica..... | 105 |
| 5.5.4 Avaliação histopatológica | 106 |
| 5.5.5 Morfometria | 107 |
| 6 CONCLUSÕES | 111 |
| 7 PERSPECTIVAS..... | 112 |
| 8 REFERÊNCIAS..... | 114 |
| 9 APÊNDICE | 120 |
| 10 ANEXOS | 128 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1. Número de publicações indexadas considerando o cruzamento das palavras-chave nano* e broiler* | 23 |
| Figura 2. Ciclo de vida da <i>Eimeria spp</i> , contemplando as fases de desenvolvimento no hospedeiro..... | 64 |
| Figura 3. Estrutura química do fármaco toltrazuril, uma triazinona simétrica. | 67 |
| Figura 4. Desenho experimental da avaliação da LNCt frente ao desafio com <i>Eimeria spp</i> | 82 |
| Figura 5. Perfil de distribuição granulométrica obtido por difração de laser de três repetições, (A) formulação NC _{S100t} (B) formulação LNCt. | 87 |
| Figura 6. Gráfico radar obtido a partir dos valores de D[4,3], d10, d50 e d90 por volume e por número, obtidos por difração de laser | 88 |
| Figura 7. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, | 92 |
| Figura 8. Reogramas de tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento obtidos em viscosímetro rotacional..... | 92 |
| Figura 9. Gráfico de intensidade de luz obtido através de análise de rastreamento de partículas..... | 94 |
| Figura 10. Microscopia das formulações contendo toltrazuril,..... | 95 |
| Figura 11. Teor de toltrazuril em função do tempo da LNCt..... | 96 |
| Figura 12. Fotomicrografias obtidas da formulação NC _{S100t} após 60 dias de armazenamento sob refrigeração e mantendo-se a formulação em repouso. (A) luz normal, (B) filtro de luz polarizada..... | 97 |
| Figura 15. Consumo total de ração dos grupos durante todo o experimento | 104 |
| Figura 16. Peso dos animais avaliado durante o experimento | 105 |
| Figura 17. Quantidade de células calciformes por vilosidade em duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte..... | 109 |
| Figura 18. Espessura da mucosa em duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte .. | 109 |
| Figura 19. Espessura das vilosidades em duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte | 110 |
| Figura 20. Cromatogramas obtidos a partir da análise de uma formulação de nanocápsulas (A) NC _{S100} , (B) LNC e (C) do fármaco livre, com comprimento de onda de análise de 250 nm e fase móvel de análise do toltrazuril. | 121 |
| Figura 21. Média da curva padrão do toltrazuril (n=3) na faixa de concentração 2,5 a 15 µg/mL. | 122 |
| Figura 22. Imagens de microscopia do duodeno de um animal de cada grupo coradas com Alcian Blue + Fast Red. | 125 |
| Figura 23. Imagens de microscopia do jejuno de um animal de cada grupo coradas com Alcian Blue + Fast Red. | 126 |
| Figura 24. Imagens de microscopia do íleo de um animal de cada grupo coradas com Alcian Blue + Fast Red..... | 127 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Composição quali-quantitativa das formulações de nanocápsulas poliméricas desenvolvidas para obtenção do volume final de 10 mL..... | 74 |
| Tabela 2. Condições analíticas cromatográficas utilizadas para quantificação do toltrazuril por CLAE-UV..... | 76 |
| Tabela 3. Grupos experimentais e administração dos tratamentos para a avaliação da eficácia da formulação LNCT <i>in vivo</i> | 83 |
| Tabela 4. Características físico-químicas das formulações LNC, NC _{S100} , LNCT e NC _{S100t} | 88 |
| Tabela 5. Diâmetro, PDI e teor das formulações LNC, LNCT, NC _{S100} e NC _{S100t} avaliados após exposição aos meios gástrico e intestinal simulados. | 98 |
| Tabela 6. Porcentagem de animais por grau de alterações características de cada espécie de <i>Eimeria</i> no intestino de frangos de corte..... | 105 |
| Tabela 7. Porcentagem de animais por graduação das alterações no intestino delgado, ceco, fígado e rim de frangos de corte..... | 107 |
| Tabela 8. Relação profundidade da cripta:tamanho da vilosidade de duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte..... | 108 |
| Tabela 9. Análise estatística ANOVA da determinação de linearidade. | 122 |

LISTA DE ABREVIATURAS

PCL: Poli- ϵ -caprolactona

AST: Aspartato aminotransferase

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

NC_{S100}: Nanocápsula polimérica de Eudragit[®] S100 branca

NC_{S100t}: Nanocápsula polimérica de Eudragit[®] S100 contendo toltrazuril

LNC: Nanocápsulade núcleo lipídico de poli- ϵ -caprolactona branca

LNCT: Nanocápsulade núcleo lipídico de poli- ϵ -caprolactona contendo toltrazuril

EHL: Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo

PDI: Índice de polidispersão

NaCl: Cloreto de sódio

UV: Luz ultravioleta

DP: Desvio padrão

DPR: Desvio padrão relativo

NTA: Análise de rastreamento de nanopartículas

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

DMEM: Meio Dulbecco's modified Eagle's - high glicose

SFB: Soro fetal bovino

RESUMO

A coccidiose é uma doença causada por protozoários intracelulares do gênero *Eimeria* que afetam o trato intestinal de frangos de corte, podendo causar perdas na produção. Usualmente, o tratamento se dá por adição dos fármacos na ração durante todo o ciclo produtivo das aves, mas problemas de resistência das cepas e resíduo dos fármacos na carcaça têm chamado à atenção do setor produtivo, neste sentido a nanoencapsulação de fármacos torna-se uma alternativa promissora. Levando isto em consideração, este estudo objetivou desenvolver, caracterizar físico-quimicamente, avaliar a segurança *in vitro* e atividade anticoccidiana *in vivo* de nanopartículas poliméricas contendo toltrazuri, que é um fármaco anticoccidiano que atua na alteração da função da cadeia respiratória e das enzimas mitocondriais, nas formas de esquizontes, macrogametócitos e microgametócitos de *Eimeria spp.*. As nanocápsulas poliméricas foram produzidas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado utilizando Eudragit® S100 (NCT) ou poli-ε-caprolactona (LNCt) como polímero estruturante. Ambas as formulações apresentaram distribuição homogênea de diâmetro de partícula na faixa nanométrica (*z-average* e $D_{(4,3)} < 200$ nm) e potencial zeta negativo ($< -8,93$ mV), característico destes polímeros. O conteúdo de fármaco foi próximo a 100% (1 mg/mL) com eficiência de encapsulação acima de 90%. As suspensões foram classificadas como fluídos newtonianos devido a relação linear entre os valores das tensões de cisalhamento e as das taxas de cisalhamento. Apesar das formulações expostas a diferentes condições de armazenamento, apresentaram teor adequado por até 60 dias, foi observado alteração do diâmetro das nanocápsulas em função do tipo de polímero empregado, sendo a LNCt a formulação mais estável (60 dias em todas as condições). Ainda, quando expostas ao meio gastrointestinal simulado de aves, não houve alteração de diâmetro e de teor das formulações. Adicionalmente, as nanocápsulas foram avaliadas *in vitro* quanto a viabilidade celular em fibroblastos aviários e atividade anticoccidiana profilática *in vivo* contra *Eimeria spp.* Com relação à segurança *in vitro*, ambas as formulações não diminuíram significativamente a viabilidade celular de fibroblastos aviários após 24 e 48 horas de exposição. Quanto à avaliação *in vivo*, observou-se que os diferentes tratamentos (LNCt 1,75, 3,5 e 7 mg/kg/dia) não influenciaram no ganho de peso dos animais em relação ao grupo controle (não tratado), e na avaliação geral histopatológica e de morfometria, os grupos tratados nas doses de 3,5 e 7

mg/Kg/dia apresentaram resultados semelhantes ao grupo tratado com o medicamento comercial na posologia indicada (Baycox[®] 7 mg/Kg/dia). Diante dos resultados obtidos, conclui-se que as formulações nanotecnológicas desenvolvidas são promissoras para o tratamento profilático da coccidiose aviária.

Palavras-chave: Coccidiose aviária, *Eimeria spp.*, toltrazuril, nanocápsulas poliméricas.

ABSTRACT

Coccidiosis is a disease caused by intracellular protozoa of the genus *Eimeria* that affect the intestinal tract of broiler chickens, which can cause production losses. Usually, the treatment is done by adding drugs to the feed throughout the production cycle of the birds, but problems of strain resistance and drug residue in the carcass have drawn the attention of the productive sector. In this sense, drug nanoencapsulation becomes a promising alternative. Taking this into account, this study aimed to develop, physicochemically characterize, evaluate the *in vitro* safety and *in vivo* anticoccidial activity of polymeric nanoparticles containing toltrazuril, an anticoccidial drug that acts on changing the function of the respiratory chain and mitochondrial enzymes, in the forms of schizont, macrogametocytes and microgametocytes of *Eimeria* spp.. Polymeric nanocapsules were produced by the preformed polymer interfacial deposition method using Eudragit® S100 (NCT) or poly- ϵ -caprolactone (LNCT) as structuring polymer. Both formulations showed homogeneous particle diameter distribution in the nanometer range (z-average and D(4.3) < 200 nm) and negative zeta potential (< -8.93 mV), characteristic of these polymers. The drug content was close to 100% (1 mg/mL) with encapsulation efficiency above 90%. The suspensions were classified as Newtonian fluids due to the linear relationship between the values of shear stresses and shear rates. Despite the formulations exposed to different storage conditions presented adequate content for up to 60 days, a change in the diameter of the nanocapsules was observed as a function of the type of polymer used, with LNCT being the most stable formulation (60 days in all conditions). Still, when exposed to the simulated gastrointestinal environment of birds, there was no change in the diameter and content of the formulations. Furthermore, they were evaluated *in vitro* for cell viability in avian fibroblasts and prophylactic anticoccidial activity *in vivo* against *Eimeria* spp. Regarding *in vitro* safety, both formulations did not significantly decrease the cell viability of avian fibroblasts after 24 and 48 hours of exposure. As for the *in vivo* evaluation, it was observed that the different treatments (LNCT 1.75, 3.5 and 7 mg/kg/day) did not influence the weight gain of the animals in relation to the control group (untreated), and in the general histopathological and morphometric evaluation, the groups treated at doses of 3.5 and 7 mg/kg/day showed similar results to the group treated with the commercial drug at the indicated dosage (Baycox® 7 mg/kg/day).

Given the results obtained, it is concluded that the developed nanotechnology formulations are promising for the prophylactic treatment of avian coccidiosis.

Keywords: Avian coccidiosis, *Eimeria spp.*, toltrazuril, polymeric nanocapsules.

1 INTRODUÇÃO

A coccidiose é uma doença causada por protozoários intracelulares do gênero *Eimeria* que afetam o trato intestinal dos animais de produção. No caso da avicultura, as infecções por *Eimeria spp.* são responsáveis por grandes perdas na produção, pois reduzem o desempenho zootécnico do plantel e, nos casos mais graves, acarretam a morte das aves. Diversos fatores de riscos estão envolvidos nos casos de coccidiose, como a alta densidade nos aviários e o manejo inadequado das aves. Por se tratar de um parasita amplamente distribuído no ambiente, diversas estratégias são utilizadas para o controle, como o uso de agentes anticoccidianos e vacinas, sendo a primeira abordagem a mais disseminada, além das boas práticas de produção, que contribuem e são adotadas nos sistemas de produção. Usualmente, os fármacos são incorporados na ração e são fornecidos durante todo o ciclo produtivo das aves, mas problemas de resistência das cepas contra os compostos disponíveis e o resíduo dos fármacos na carcaça têm chamado a atenção do setor produtivo, alertando para a busca de novas abordagens para o manejo desta parasitose.

A nanotecnologia aplicada a produtos veterinários é uma área de pesquisa e desenvolvimento tecnológico ainda incipiente, mas que vem crescendo significativamente nos últimos anos. Uma busca nos bancos de dados da *Web of Science* mostra que a partir dos anos de 2011 há um aumento das publicações referentes a nanotecnologia no desenvolvimento de produtos de uso veterinário e, quando se relaciona especificamente com produtos para frangos de corte, observa-se o mesmo cenário (Figura 1).

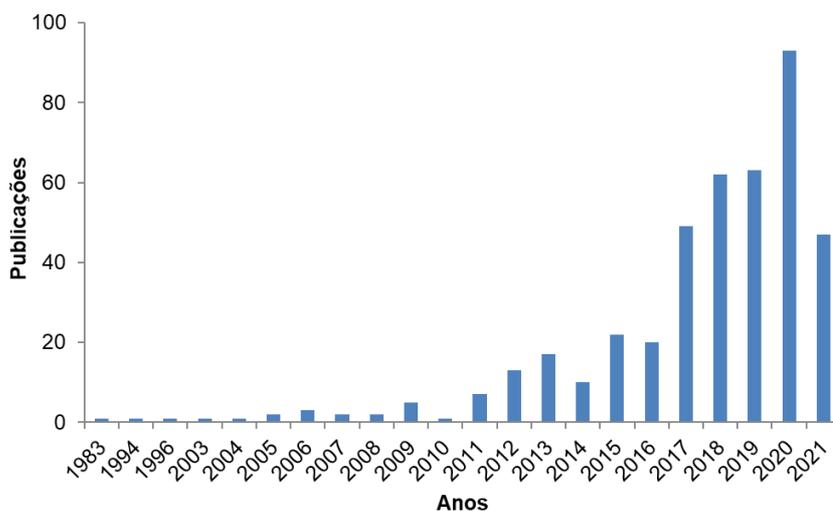


Figura 1. Número de publicações indexadas considerando o cruzamento das palavras-chave nano* e broiler* (*Web of Science*, acessado em 23 agosto, 2021).

Neste contexto, especificamente da coccidiose, praticamente não há relatos na literatura do uso de sistemas nanoestruturados como estratégia terapêutica frente à infecção por *Eimeria spp.* Logo, considerando que o Brasil é um dos líderes mundiais da produção de frangos de corte, no sentido de agregar valor à cadeia produtiva de insumos agropecuários e a busca de novas abordagens para o manejo desta parasitose, abre-se a oportunidade de investimento na nanotecnologia farmacêutica veterinária, sobretudo com a tendência mundial de redução/retirada do uso de agentes antimicrobianos na produção animal. Desta forma, a nanotecnologia, por meio do desenvolvimento de nanocarreadores de fármacos, mostra-se uma alternativa promissora para o controle da coccidiose, pois é possível, via nanoencapsulação, melhorar o efeito biológico de fármacos, reduzindo o número de doses administradas e possíveis efeitos tóxicos.

O toltrazuril é um fármaco anticoccidiano (triazinona simétrica) que atua principalmente na alteração da função da cadeia respiratória e das enzimas mitocondriais, nas formas de esquizontes, macrogametócitos e microgametócitos de *Eimeria spp.* Assim, no sentido de aprimorar a terapia do toltrazuril para a coccidiose aviária, é importante estudar novas formas para possibilitar melhor penetração nas células e melhor entrega do fármaco no seu local de ação, como alternativa de contornar a resistência antimicrobiana, possibilitando também maior estabilidade, e consequente, diminuição da dose administrada, sem causar dano celular. Neste contexto, a utilização da nanotecnologia é uma estratégia promissora para contornar a resistência aos antiparasitários e redução dos resíduos nos derivados de origem animal.

Desta forma, justifica-se o desenvolvimento deste estudo e objetiva-se a obtenção de uma nanoformulação caracterizada físico-quimicamente e biologicamente, que servirá de plataforma tecnológica para outros fármacos anticoccidianos de uso veterinário e como alternativa para agentes ineficazes no controle desta parasitose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas contendo um fármaco anticoccidiano (toltrazuril) para o tratamento profilático de coccidiose em frangos de corte.

2.2 Objetivos específicos

Revisar a literatura acerca do uso da nanotecnologia no desenvolvimento de sistemas para terapias veterinárias;

Desenvolver e caracterizar físico-quimicamente nanopartículas poliméricas, com dois diferentes polímeros estruturantes, contendo como fármaco anticoccidiano o toltrazuril;

Avaliar a estabilidade química e física nas formulações desenvolvidas;

Avaliar a viabilidade celular de fibroblastos aviários após tratamento com as formulações desenvolvidas, como um indicativo inicial de segurança;

Avaliar a atividade *in vivo* das nanoformulações contendo fármaco anticoccidiano contra *Eimeria spp.*

**CAPÍTULO I: Proposição de artigo de revisão de literatura intitulado:
“EMPREGO DA NANOTECNOLOGIA EM TERAPIAS VETERINÁRIAS”**

ARTIGO EM FASE DE REVISÃO PARA FUTURA SUBMISSÃO

Este capítulo trata-se de um artigo de revisão para futura submissão em revista científica, segue o resumo do artigo:

Nanopartículas carreadoras de substâncias ativas vem recebendo atenção para o uso veterinário. Permitem controlar a liberação de fármacos, reduzindo o número de doses administradas e, conseqüentemente, reduzindo possíveis efeitos tóxicos nos animais. Assim, o objetivo desta revisão foi apresentar características das nanopartículas mais empregadas em estudos com finalidade de uso veterinário e os resultados *in vitro* e *in vivo* associados a substâncias ativas nanoencapsuladas. O estudo compilou artigos das bases de dados *Web of Science* e *Pubmed* com desenvolvimento e avaliação de diferentes nanopartículas, tanto orgânicas quanto inorgânicas, para o diagnóstico e tratamento de diversas patologias, em inúmeras espécies animais. Destacaram-se estudos do emprego da nanotecnologia para o diagnóstico e tratamento do câncer, tratamento de infecções bacterianas e parasitoses, além daqueles que avaliaram a suplementação nutricional e a castração química. Após análise deste compilado de informações, conclui-se que a nanotecnologia é uma ferramenta promissora para melhorar os resultados no tratamento de doenças que acometem diferentes espécies animais, adicionalmente, foi possível observar que ainda é uma área em expansão, principalmente quando se refere a animais de corte.

CAPÍTULO II: Revisão, Metodologias, Resultados e Discussão acerca da parte experimental desenvolvida ao longo do mestrado acadêmico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Coccidiose aviária

A coccidiose é uma doença de grande relevância na avicultura industrial, seja para frangos de corte ou de postura (SOLIS, 2005). Em nível mundial, estima-se que os custos em virtude das infecções por *Eimeria spp.* sejam em torno de US\$ 2,4-3 bilhões, sendo 76% deste montante em virtude das infecções (clínicas e subclínicas) e 24% devido aos gastos com tratamento (profilático ou terapêutico). No Brasil, um dos maiores produtores e exportadores de frangos de corte do mundo (13,8 e 4, milhões de toneladas, respectivamente em 2020), a prevalência de coccidiose é 25% e os prejuízos podem chegar a US\$ 19 milhões/ano (LUCHESE et al., 2007; AHMAD; EL-SAYED; EL-SAYED, 2016; ABPA, 2021).

Coccidiose é uma doença entérica, causada pelo parasito do filo Apicomplexa, do gênero *Eimeria spp.* Foi relatado que mais de 1000 espécies de *Eimeria* infectam diferentes animais hospedeiros, como frango, pato, peru, gado, coelho, ovelha, cão doméstico e gato. Em galinhas, sete espécies foram descritas, sendo: *E. tenella*, *E. mitis*, *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. necatrix* e *E. praecox* (FATOBA; ADELEKE, 2018).

3.2 Ciclo de reprodução da *Eimeria spp.*

De acordo com a espécie, o ciclo de vida das *Eimerias* é de quatro a sete dias. A doença ocorre quando o hospedeiro ingere oocistos esporulados, podendo ser através de poeira, fezes, cama e insetos, e pode ser considerada como resultado da ingestão de múltiplas cepas de *Eimeria spp.* Essa coinfeção de espécies de *Eimeria spp.* é comum em coccidioses, o que contribui para a patogenicidade e resulta em diagnóstico equivocado (QUIROZ-CASTAÑEDA; DANTÁN-GONZÁLEZ, 2015; FATOBA; ADELEKE, 2018).

O ciclo da coccidiose é dividido em várias fases e desenvolve-se em um único hospedeiro (monoxeno), com multiplicação assexuada (merogonia ou esquizogonia), sexuada (gametogonia) dentro das células do hospedeiro e desenvolvimento no meio

ambiente chamado esporogonia. Essa fase requer oxigênio e tem duração de aproximadamente 24 horas (GAZONI, 2015).

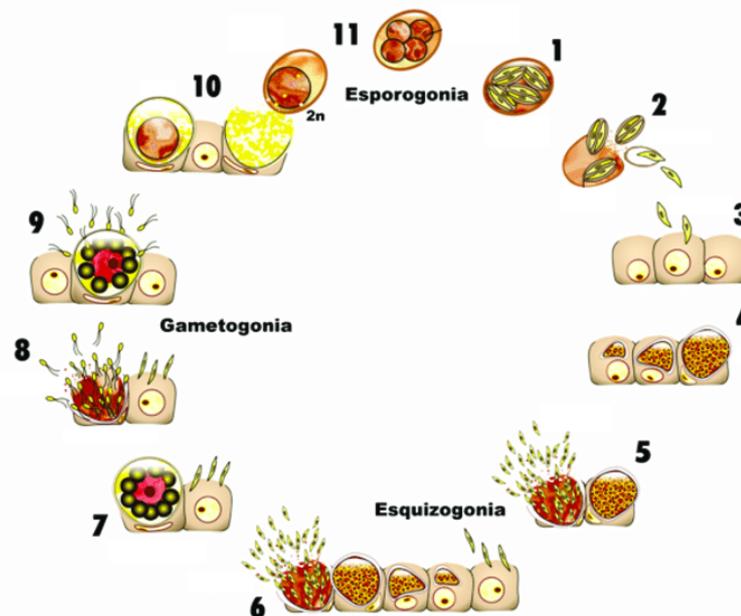


Figura 2. Ciclo de vida da *Eimeria spp*, contemplando as fases de desenvolvimento no hospedeiro.

Fonte: NOVAES et al., 2011.

O oocisto, quando ingerido é rompido na moela por ação mecânica, liberando os esporocistos. No intestino, devido a presença de sais biliares e enzimas, os esporozoítos saem ativos do esporocisto e penetram nas células epiteliais intestinais. Nesta fase, ocorre diversos ciclos intestinais endógenos, onde os parasitas se multiplicam por fissão múltipla (merogonia ou esquizogonia) resultando na formação de esquizontes, que contêm centenas de merozoítos (Figura 2) (NOVAES et al., 2011).

Na sequência, ocorre a fase sexuada do ciclo, gamogonia ou gametogonia, onde os merozoítos diferenciam-se em macrogametócito, gamonte feminino ou microgametócito, gamonte masculino. Após a fecundação do macrogameta pelo microgameta há a formação do oocisto, sendo liberado no ambiente nas fezes. Em condições favoráveis de oxigênio, temperatura e umidade, o oocisto sofre um processo de esporulação, onde meiose e mitose resultam na formação do oocisto esporulado que contém quatro esporocistos com dois esporozoítos em cada (NOVAES et al., 2011; GAZONI, 2015).

3.3 Sintomas causados pela coccidiose

As *Eimerias spp.*, quando nas células intestinais, modificam drasticamente as estruturas e a aparência das vilosidades intestinais. Estudos realizados observaram que há uma diminuição na altura das vilosidades da mucosa intestinal comprometendo a saúde intestinal, conseqüentemente, reduzindo a capacidade absorptiva dos nutrientes do bolo alimentar. Dependendo da espécie, magnitude e local da infecção, a coccidiose pode resultar numa enterite limitada, resultando em perda de fluidos e má absorção de nutrientes, inflamação da parede intestinal com hemorragias pontuais e descamação dos epitélios, ou destruição completa dos vasos, levando a extensa hemorragia e morte. Ainda, a infecção pode causar alterações na permeabilidade da mucosa, resultando em vazamento de proteínas plasmáticas para o lúmen intestinal, aumento do pH e diminuição da motilidade intestinal (CHAPMAN, 2014; GAZONI, 2015).

A gravidade da infecção depende de alguns fatores tais como, a quantidade de oocistos ingeridos, do grau de virulência das cepas e da suscetibilidade do hospedeiro. Assim, na avicultura, as infecções por *Eimeria spp.* são responsáveis por grandes perdas na produção, pois reduzem o desempenho zootécnico do plantel e, nos casos mais graves, acarretam a morte das aves. Diversos fatores de riscos estão envolvidos nos casos de coccidiose, como a alta densidade nos aviários e o manejo inadequado das aves (CHAPMAN, 2014; GAZONI, 2015).

Por isso, há necessidade de um bom manejo, reduzindo assim a exposição aos oocistos infectantes. Também, é importante evitar a umidade da cama, que é um meio para prevenir a esporulação dos oocistos e é muito interessante o monitoramento de rotina do trato gastrointestinal dos frangos de corte para diagnosticar a coccidiose e possibilitar seu tratamento (GAZONI, 2015).

3.4 Profilaxia e tratamento da coccidiose

Oocistos de *Eimeria spp.* são geralmente presentes em ambientes em que as aves são criadas. Algumas medidas podem ser tomadas para a diminuição, como a substituição da cama de aviário entre rebanhos sucessivos, mas reduz a coccidiose até certo ponto e não é totalmente eficaz na prevenção de um surto. Por isso, estão

em constante desenvolvimento diversas alternativas para o controle desta doença (SHIVARAMAIAH et al., 2014; FATOBA; ADELEKE, 2018).

A vacinação contra a coccidiose depende do desenvolvimento natural da imunidade protetora. As vacinas convencionais incorporam parasitas vivos ou atenuados como uma mistura de várias espécies, ou às vezes até várias cepas de *Eimeria*. Embora exista uma grande variação antigênica entre espécies, os estágios iniciais de desenvolvimento no hospedeiro são considerados mais importantes para a melhoria de uma resposta imune protetora. Ainda, existe uma área que busca alternativas sem drogas para o controle da coccidiose, que incluem o uso de probióticos, produtos fitoquímicos e extratos fúngicos, onde observaram aumento na imunidade, atividades protetivas e melhora no desempenho. No entanto, estratégias de controle alternativas devem se concentrar na integração de alternativas já comprovadas em um programa integrado para o controle de coccidiose (SHIVARAMAIAH et al., 2014; QUIROZ-CASTAÑEDA; DANTÁN-GONZÁLEZ, 2015).

Assim, os efeitos protetores das sulfonamidas foram extensivamente avaliados e utilizados como os primeiros agentes anticoccidianos efetivos e foi levantada a hipótese que esses compostos ajudaram a ave a adquirir imunidade contra essa doença. Também, o uso de ionóforos como coccidiostáticos eficazes está bem documentado e tem sido utilizado há décadas. Os ionóforos atuam nos estágios esporozoítos/merozoítos do ciclo de vida do parasita, ligando-se a cátions e interferindo no potencial osmótico, interrompendo a integridade da membrana (SHIVARAMAIAH et al., 2014; QUIROZ-CASTAÑEDA; DANTÁN-GONZÁLEZ, 2015).

Desta forma, no início dos anos 70, várias drogas sintéticas foram introduzidas comercialmente e utilizadas desde o dia da eclosão até um dia antes do abate. Amprolium, nicarbazin, diclazuril e toltrazuril têm sido utilizados com sucesso no controle da coccidiose há muitos anos. O modo de ação dessas substâncias químicas é semelhante, e a maioria inibe o desenvolvimento de esporozoítos/merozoítos. Além disso, também é hipotetizado que esses compostos não interfiram no desenvolvimento da imunidade natural contra a coccidiose (SHIVARAMAIAH et al., 2014; FATOBA; ADELEKE, 2018).

3.5 Toltrazuril

Como já descrito, vários medicamentos são utilizados para o tratamento da coccidiose, sozinhos ou em associação. O toltrazuril (Figura 3) é um fármaco anticoccidiano pertencente a classe das triazinonas simétricas, atuando principalmente na alteração da função da cadeia respiratória e das enzimas mitocondriais, nas formas de esquizontes, macrogametócitos e microgametócitos de *Eimeria spp.* Sendo adicionado na ração ou na água das aves na fase subclínica, este fármaco age na faixa etária em que se detecta surtos da doença nos animais (SILVA, 2015).

No entanto, o problema desta estratégia no controle da doença é o aparecimento de isolados resistentes a fármacos contra o parasito *Eimeria spp.* (FATOBA; ADELEKE, 2018). Ainda, os resíduos de medicamentos veterinários em produtos de aves podem ser transmitidos aos seres humanos através do consumo de carnes. A exposição baixa e contínua a antimicrobianos desencadeia várias implicações patológicas que são consideradas importantes problemas de saúde pública. A carne de frango contaminada com resíduos de fármacos pode levar a formação bacteriana resistente a antibióticos, manifestações alérgicas ou alteração da microflora útil do trato digestivo dos seres humanos (MUND et al., 2016). Outra característica que deve ser levada em consideração é o fato do toltrazuril apresentar baixa solubilidade em água, o que dificulta sua administração em veículo aquoso.

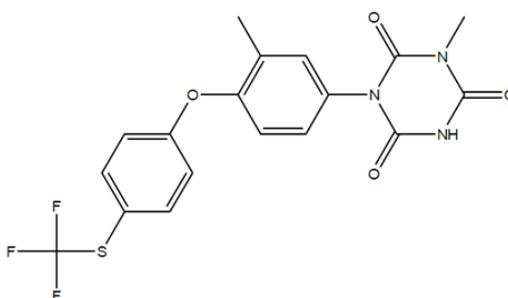


Figura 3. Estrutura química do fármaco toltrazuril, uma triazinona simétrica.
Fonte: OLSEN et al., 2012.

3.6 Nanotecnologia aplicada a terapêutica

Os sistemas de liberação de fármacos vêm ganhando atenção em virtude da necessidade de melhorar a ação de fármacos no organismo. Dentre esses sistemas destacam-se as nanopartículas. Esses sistemas são carreadores de substâncias ativas que apresentam diâmetro inferior a 1 µm e são utilizados para vetorizar ativamente ou passivamente fármacos, controlar temporalmente sua liberação, aumentar a estabilidade de substâncias lábeis, aumentar a solubilidade aparente de substâncias pouco solúveis e minimizar os efeitos adversos e a possível toxicidade que substâncias bioativas podem apresentar em tecidos ou órgãos saudáveis. As nanopartículas por apresentarem um tamanho menor que as micropartículas têm uma maior facilidade de transpor as barreiras e penetrarem mais facilmente em tecidos (SANDRI et al., 2019).

O termo nanopartícula inclui uma série de diferentes sistemas, destacando-se as nanoemulsões, nanopartículas poliméricas e lipídicas. As nanopartículas constituem um sistema de entrega de fármaco versátil, devido à sua capacidade de superar as barreiras fisiológicas e direcionar o fármaco para as células específicas ou para compartimentos intracelulares por diferentes mecanismos (MALLIPEDDI; ROHAN 2010).

Sistemas nanométricos apresentam elevada área superficial, sendo considerados vetores para a administração de fármacos lipofílicos, proporcionando liberação homogênea e controlada, aumentando assim, a resposta terapêutica no sítio de ação. A vetorização em órgãos, tecidos ou células específicas também apresenta o benefício de redução dos efeitos adversos apresentados sistemicamente pelo fármaco. Ainda, o uso de materiais poliméricos para a encapsulação de fármacos é uma alternativa interessante para mascarar as propriedades físico-químicas intrínsecas da substância, melhorar sua interação com membranas e facilitar sua absorção ou penetração cutânea (GUTERRES et al., 2007). Ainda, nanopartículas lipídicas sólidas foram propostas como uma alternativa às nanopartículas poliméricas. Elas são partículas de diâmetro nanométrico, esféricas e são constituídas de lipídeos sólidos e emulsionantes (ALUDKA et al., 2011).

Assim, a incorporação de fármacos de uso veterinário a nanossistemas apresenta diversas vantagens, além do efeito farmacológico inerente ao composto. A

nanoencapsulação possibilita reduzir a quantidade de doses e a concentração administrada do fármaco, reduzir os resíduos nos derivados de origem animal, reduzir efeitos adversos e toxicidade. Ainda, oferecem um meio promissor de liberação de fármacos com eficácia aumentada, taxas de liberação controladas, bioatividade prolongada e a capacidade de *delivery* de múltiplos fármacos com efeitos sinérgicos no mesmo local (BRANDÃO et al., 2011; JABIR et al., 2012).

3.7 Polímeros biocompatíveis

A melhora no desenvolvimento de sistemas poliméricos de liberação controlada de fármacos, seja, nanopartículas ou outros sistemas, depende também da seleção de um agente polimérico apropriado, ou seja, que seja capaz de controlar a liberação do fármaco, sustentar a ação terapêutica ao longo do tempo e liberar o fármaco em um determinado tecido ou órgão alvo. Na área médica, os polímeros que podem ser utilizados necessitam ser biocompatíveis com os sistemas biológicos e biodegradáveis, ou seja, que possam ser degradados por enzimas ou hidrólise (BRUGUEL, 2015). Existem diversos polímeros com essas características e a seguir são apresentados os relevantes para este estudo.

3.7.1 Poli- ϵ -caprolactona

Dentre os polímeros utilizados a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) se destaca devido sua biocompatibilidade, permitindo aplicações nos campos biomédico e farmacêutico (SANDRI *et al.*, 2019). A PCL apresenta boa solubilidade em solventes orgânicos comuns e pode ser degradada enzimaticamente. Ainda, é um polímero semicristalino que apresenta degradação mais lenta quando comparado aos polímeros amorfos, é tenaz e flexível, possui baixa temperatura de transição vítrea, e funde-se a cerca de 60 °C, apresentando boas propriedades mecânicas e potencial para uso como biomaterial (ROA et al., 2010).

3.7.2 Eudragit® S100

O Eudragit® S100 é produzido por copolimerização aniônica de ácido metacrílico e metacrilato de metila. Sua liberação dependente de pH, a proteção especialmente em pH baixo, as enzimas e a umidade do ambiente, levaram o Eudragit® S100 a ser utilizado para o desenvolvimento de nanopartículas. Assim, este polímero mostra-se uma alternativa interessante para o revestimento entérico e uma administração sustentada, protegendo os compostos encapsulados enquanto passam pelo estômago para liberar o medicamento por longos períodos no intestino (RADBEH et al., 2020).

3.8 Nanotecnologia empregada no tratamento de frangos de corte

Diversos autores buscaram principalmente o uso da nanotecnologia no tratamento nutricional dos animais, como aditivos alimentares, na suplementação, aumento de peso e qualidade da carcaça (HOSSEINI; MEIMANDIPOUR, 2018; NOURI, 2019). Dentre esses estudos, Meimandipour et al. (2017) também objetivaram avaliar a utilização de Aloe vera, urtiga e endro nanoencapsulados na dieta de aves como aditivos alimentares, para melhorar o desempenho, características de carcaça e concentrações de imunoglobulina sérica (IgM e IgY) em frangos de corte. Os resultados revelaram que aumentar os extratos de ervas não encapsuladas e nanoencapsuladas para 0,05% nas dietas de finalização melhorou o ganho de peso corporal no período de 28 a 42 dias. Ainda, as aves alimentadas com extrato de endro nanoencapsulado apresentaram um ganho de peso corporal maior em comparação ao grupo com antibiótico. A adição de extrato de urtiga nanoencapsulada na dieta melhorou a eficiência da conversão alimentar no período de 28 a 42 dias em comparação ao grupo com antibiótico. Em comparação com o grupo antibiótico, a nanoencapsulação do extrato de endro poderia melhorar profundamente o desempenho do crescimento e, portanto, pode ser usada como substituto dos antibióticos na dieta de frangos de corte. Gangadoo et al. (2020) também com a intenção de utilizar aditivos alimentares para frangos de corte, testaram o uso de nanopartículas de selênio para melhor distribuição e absorção deste oligoelemento, sem causar toxicidade. O uso de selênio inorgânico na alimentação de aves demonstrou menor biodisponibilidade no tecido mamário e duodeno, e aumento da acumulação nos órgãos envolvidos nos processos de desintoxicação, em comparação

com a suplementação orgânica de selênio e nanopartículas de selênio. Os resultados indicam que as nanopartículas de selênio podem potencialmente ser usadas na alimentação de aves como um aditivo de oligoelementos.

Pesquisas na área de antimicrobianos para aves também foram desenvolvidas utilizando a nanotecnologia. Rassouli et al. (2016) compararam os parâmetros de biodisponibilidade e farmacocinéticos da tilmicosina após administração oral de fosfato de tilmicosina em três tipos de nanopartículas lipídicas de tilmicosina, incluindo nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados e nanocápsulas de núcleo lipídico. A biodisponibilidade relativa das três nanopartículas contendo tilmicosina foi maior em relação ao fosfato de tilmicosina. A concentração plasmática máxima de fármaco também se apresentou maior após tratamento com nanopartículas de tilmicosina. Em conclusão, esses sistemas melhoraram os parâmetros de biodisponibilidade e farmacocinética do medicamento, especialmente a formulação de nanocápsulas de núcleo lipídico, o que sugere um sistema de entrega eficiente para a tilmicosina. Ainda, Mohammed e Aziz (2019) avaliaram a eficiência do composto quitosana, de nanopartículas de óxido de zinco e do composto quitosana/nanopartículas de óxido de zinco contra cepas de *Campylobacter*. A presença de quitosana/ZnONPs levou ao aumento da eficiência da quitosana contra isolados de *Campylobacter* de frangos de corte e seu ambiente. Além disso, foi registrado um efeito letal completo do composto de quitosana/ZnONPs a uma concentração de 0,5 µg/mL e ZnONPs a uma concentração de 1,5 µg/mL. Os resultados mostraram que estas formulações são eficientes contra *Campylobacter* e podem ser utilizadas como uma alternativa aos agentes antimicrobianos ineficazes.

Alguns estudos avaliaram as propriedades da curcumina nanoencapsulada no tratamento de aves de produção. Sayrafi et al. (2017) avaliaram os possíveis efeitos protetores da nanocurcumina contra a toxicidade hepática induzida pela salinomicina em frangos de corte. A salinomicina é um medicamento poliéter pertencente ao grupo ionóforo e tem sido amplamente utilizado por vários anos como anticoccidiano em diferentes espécies, como as aves. Os medicamentos ionóforos devem ser administrados com grande precaução, pois apresentam baixo índice terapêutico e qualquer overdose ou uso incorreto leva a toxicidade irreversível. Os resultados mostraram que a nanocurcumina diminuiu os níveis séricos médios de AST em comparação com o grupo salinomicina e diminuiu a incidência e a gravidade das

lesões hepáticas histopatológicas. Assim, os resultados deste estudo indicaram que a nanocurcumina poderia proteger o fígado contra a toxicidade induzida pela salinomicina.

Outro estudo foi conduzido para avaliar o efeito da suplementação dietética com nanocurcumina nas características da carcaça e nas propriedades físicas e químicas da carne de peito de frango infectado com *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* e *Eimeria tenella*. As características de carcaça do grupo infectados/medicados (nanocurcumina 300 mg/kg) melhoraram significativamente em comparação com os grupos infectado/não medicado e infectados/medicados (nanocurcumina 400 mg/kg). Considerando as perdas econômicas devido aos efeitos negativos da coccidiose na taxa de crescimento e na qualidade da carne de frangos de corte, a nanocurcumina, como antioxidante ou aditivo alimentar natural e seguro, pode ser uma promissora abordagem para melhorar o valor nutricional e os fatores organolépticos da carne de aves durante o prazo de validade (PARTOVI et al., 2019).

RESUMO DOS MATERIAIS E MÉTODOS

Esta parte trata das metodologias e resultados utilizados para a elaboração de um manuscrito para publicação, por isso foram suprimidos.

Estão descritos os materiais, equipamentos e metodologias empregados no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo toltrazuril e na avaliação das características nanotecnológicas. Ainda, apresenta metodologias de avaliação da segurança *in vitro* e eficácia profilática *in vivo*.

Na sequência são apresentados os resultados, nos quais as nanopartículas poliméricas contendo toltrazuril foram produzidas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado utilizando Eudragit® S100 (NCt) ou poli-ε-caprolactona (LNCt) como polímero estruturante. Ambas as formulações apresentaram distribuição homogênea de diâmetro de partícula na faixa nanométrica (*z-average* e $D_{(4,3)} < 200$ nm) e potencial zeta negativo ($< -8,93$ mV), característico destes polímeros. O conteúdo de fármaco foi próximo a 100% (1 mg/mL) com eficiência de encapsulação acima de 90%. As formulações expostas a diferentes condições de armazenamento apresentaram teor adequado por até 60 dias, sendo a LNCt a formulação mais estável. Ainda, quando expostas ao meio gastrointestinal simulado de aves, não houve alteração de diâmetro e de teor das formulações.

Com relação à segurança *in vitro*, ambas as formulações não diminuíram significativamente a viabilidade celular de fibroblastos aviários após 24 e 48 horas de exposição. Em 72 h, em geral, as nanoformulações foram seguras, exceto a NC_{S100t} na maior dose avaliada (~60% de viabilidade celular). Além disso, a citotoxicidade verificada deu-se apenas por danos à membrana plasmática, não ocorrendo danos ao material genético celular. Quanto à avaliação *in vivo*, observou-se que os diferentes tratamentos (LNCt 1,75, 3,5 e 7 mg/kg/dia) não influenciaram no ganho de peso dos animais em relação ao grupo controle (não tratado). Na avaliação geral histopatológica e de morfometria, os grupos tratados nas doses de 3,5 e 7 mg/Kg/dia apresentaram resultados semelhantes ao grupo tratado com o medicamento comercial na posologia indicada (Baycox® 7 mg/Kg/dia). Concluindo assim, que a nanoencapsulação é capaz de diminuir a dose efetiva de toltrazuril pela metade e as formulações nanotecnológicas são promissoras para o tratamento profilático da coccidiose aviária.

8 REFERÊNCIAS

AHMAD, T. A.; EL-SAYED, B. A.; EL-SAYED, L. H. Development of immunization trials against *Eimeria* spp. **Trial in Vaccinology**, v. 5, p. 38-47, 2016.

ABPA. Relatório Anual 2021 – Associação Brasileira de Proteína Animal. Disponível em: http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2021/04/ABPA_Relatorio_Anual_2021_web.pdf

ALUKDA, D. et al. Formulation of tenofovir-loaded functionalized solid lipid nanoparticles intended for HIV prevention. **Journal of Pharmaceutical Science**. v.100, p. 3345–3356, 2011.

ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 341, n. 1-2, p.215-220, 2007.

ANTONOW, M. B. et al. Liquid formulation containing doxorubicin-loaded lipid-core nanocapsules: cytotoxicity in human breast cancer cell line and *in vitro* uptake mechanism. **Materials Science And Engineering: C**, v. 76, p. 374-382, 2017.

BIANCHIN, M. D. et al. Radar charts based on particle sizing as an approach to establish the fingerprints of polymeric nanoparticles in aqueous formulations. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, [S.L.], v. 30, p. 180-189, dez. 2015.

BRANDÃO, H.M. et al. Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. Revista CFMV, v. 53, p. 61-67, 2011.

BRASIL. Resolução – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Guia para validação de métodos analíticos. Diretoria colegiada, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brasília, DF, 11/06/2017.

BRUGUEL, K. A. A. **Estudo da liberação controlada de derivados de ácido cinâmico utilizando sistemas baseados em polímeros biodegradáveis/biocompatíveis**. 89 f. TCC (Graduação) - Curso de Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.

BOISEN, S.; FERNÁNDEZ, J.A. Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by *in vitro* analyses. **Animal Feed Science And Technology**, Tjele, v. 68, p. 277-286, 1997.

BRUINSMANN, F. A. et al. Erlotinib-Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsules Improve *In Vitro* Cytotoxicity and Anticlonogenic Effects on Human A549 Lung Cancer Cells. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, Porto Alegre, v. 229, n. 21, 2020.

CARRIÈRE, F. Impact of gastrointestinal lipolysis on oral lipid-based formulations and bioavailability of lipophilic drugs. **Biochimie**, v. 125, p. 297-305, 2016.

CARVALHO, P. M. et al. Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development. **Frontiers In Chemistry**, v. 6, p. 1-17, 2018.

CHAPMAN, H. D. Milestones in avian coccidiosis research: A review. **Poultry Science**, v. 93, n. 3, p. 501-511, 25 fev. 2014.

CHAVES, P. S. et al. Mucoadhesive Properties of Eudragit®RS100, Eudragit®S100, and Poly(ε-caprolactone) Nanocapsules: influence of the vehicle and the mucosal surface. **Aaps Pharmscitech**, v. 19, n. 4, p. 1637-1646, 2018.

DEGOBERT, G. et al. Lyophilization of Nanocapsules: instability sources, formulation and process parameters. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 1112, 21 jul. 2021.

FANGUEIRO, J. F. et al. A novel lipid nanocarrier for insulin delivery: production, characterization and toxicity testing. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 18, n. 3, p. 545-549, 2011.

FATOBA, A. J.; ADELEKE, M. A. Diagnosis and control of Chicken coccidiosis: a recent update. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 42, n. 4, p. 483-493, 29 out. 2018.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial Polymer deposition following solvent displacement. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 55, p. 1-4, 1989.

FONTANA, M. et al. Controlled release of raloxifene by nanoencapsulation: effect on in vitro antiproliferative activity of human breast cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, p. 2979-2991, 2014.

FRIEDRICH, R. B. et al. Nanoencapsulation of Tacrolimus in Lipid-Core Nanocapsules Showed Similar Immunosuppressive Activity After Oral and Intraperitoneal Administrations. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 1599-1609, 1 ago. 2014.

GANGADOO, Sheeana. et al. Nanoparticles of selenium as high bioavailable and non-toxic supplement alternatives for broiler chickens. **Environmental Science And Pollution Research**, p. 1-8, 2020.

GAZONI, F. L. Prevalência de coccidiose e correlação com a saúde intestinal de frangos de corte em agroindústrias brasileiras entre os anos de 2012 a 2014. 2015. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

GUTERRES, S. S. et al. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HOSSEINI, S. A.; MEIMANDIPOUR, A. Feeding broilers with thyme essential oil loaded in chitosan nanoparticles: an eficiente strategy for successful delivery. **British Poultry Science**, v. 59, n. 6, p.669-678, 15 out. 2018.

JABIR, N. R. et al. Nanotechnology-based approaches in anticâncer research. **International Journal Of Nanomedicine**, [s.l.], p.4391-4408, ago. 2012.

JORNADA, D. S. et al. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft Matter**, v. 8, n. 24, p. 6646-6655, 2012.

LUCHESE F. C. et al. Prevalência de espécies de *Eimeria* em frangos de criação industrial de alternativa. **Brazil Journal Veterinary Animal Science**, v. 44, p. 81-86, 2007.

MALLIPEDDI R., ROHAN L. C. Nanoparticle-based vaginal drug delivery systems for HIV prevention. *Expert Opin. Drug Delivery*. 7(1) p.37-48, 2010.

MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer nano series user manual**. 2013.

MEIMANDIPOUR, Amir et al. Effects of nanoencapsulated aloe vera, dill and nettle root extract as feed antibiotic substitutes in broiler chickens. **Archives Animal Breeding**, v. 60, n. 1, p.1-7, 2017.

MOHAMMED, A. N.; AZIZ, S. A. A. A. The prevalence of *Campylobacter* species in broiler flocks and their environment: assessing the efficiency of chitosan/zinc oxide nanocomposite for adopting control strategy. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 26, n. 29, 2019.

MOURA, J. U. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação preliminar da citotoxicidade de nanopartículas de mangiferina**. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2014.

MUND, M. D. et al. Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: A review. **International Journal Of Food Properties**, [s.l.], v. 20, n. 7, p.1433-1446, 29 jul. 2016.

NOURI, A. Chitosan nano-encapsulation improves the effects of mint, thyme, and cinnamon essential oils in broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 60, n. 5, p.530-538, 2019.

NOVAES, J. et al. Aspectos gerais da biologia do genoma, transcriptoma e proteoma de *Eimeria spp.* de galinha doméstica. **Revista da Biologia**, v. 6, p.7-11, jun. 2011.

OLIVEIRA, C. P. et al. Na algorithmto determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v. 9, n. 4, p. 1141-1150, 2013.

OLIVEIRA, E. G. et al. Reconstituted spray-dried phenytoin-loaded nanocapsules improve the in vivo phenytoin anticonvulsant effect and the survival time in mice. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 551, n. 1-2, p. 121-132, 2018.

OLSEN, J. et al. Development of an analytical methodology for the determination of the antiparasitic drug toltrazuril and its two metabolites in surface water, soiland animal manure. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 755, p.69-76, nov. 2012.

PARTOVI, R. et al. Effects of dietary supplementation with nanocurcumin on quality and safety of meat from broiler Chicken infected with *Eimeria* species. **Journal Of Food Safety**, [s.l.], v. 39, n. 6, p.1-9, 2 out. 2019.

POHLMANN, A. R. et al. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 623-638, 7 fev. 2013.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; DANTÁN-GONZÁLEZ, E. Control of Avian Coccidiosis: Future and Present Natural Alternatives. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2015, p.1-11, 2015.

RADBEH, Z. et al. Novel carrier sensuring enhanced anti-cancer activity of Cornus mas (cornelian cherry) bioactive compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 125, p.1-8, maio 2020.

RASSOULI, A.; et al. Pharmacokinetics and bioavailability of three promising tilmicosin-loaded lipid nanoparticles in comparison with tilmicosin phosphate following oral administration in broiler chickens. **Turkish Journal Of Veterinary And Animal Sciences**, [s.l.], v. 40, p.540-547, 2016.

REYNOLDS, K.L. et al. Changes with age in density of goblet cells in the small intestine of broiler chicks. **Poultry Science**, [S.L.], v. 99, n. 5, p. 2342-2348, 2020.

ROA, J. P. B. et al. Síntese e caracterização do copolímero poli(3-hidroxiobutirato-co- ϵ -caprolactona) a partir de poli (3-hidroxiobutirato) e poli(ϵ -caprolactona). **Polímeros**, v. 20, n. 3, p.221-226, 2010.

RUANGPANIT, Y. et al. Effect of trehalose supplementation on growth performance and intestinal morphology in broiler chickens. **Veterinary And Animal Science**, [S.L.], v. 10, p. 100142, dez. 2020.

SANDRI, S. et al. Direct effects of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules on human immunecells. **Nanomedicine**, v. 14, n. 11, p. 1429-1442, 2019.

SAYRAF, R. et al. The protective effects of nanocurcumin on liver toxicity induced by salinomycin in broiler chickens. **Revue Médecine Vét.** v. 168, n. 7-9, 136-142, 2017.

SEVERINO, P. et al. Crystallinity of Dynasan®114 and Dynasan®118 matrices for the production of stable Miglyol®-loaded nanoparticles. **Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry**, v. 108, n. 1, p. 101-108, 2011.

SHIVARAMAIAH, S. et al. Coccidiosis: recente advancements in the immunobiology of *Eimeria* species, preventive measures, and the importance of vaccination as a control tool Against these Apicomplexan parasites. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, p.23-34, abr. 2014.

SILVA, M. S. Desenvolvimento e validação de um método indicativo da estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação simultânea de diferentes antiparasitários em suas formulações farmacêuticas veterinárias. 66 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2015.

SOLIS, J. **Manual Técnico sobre coccidiose aviária**. Laboratório BIOVET. Manual. Tyzzer E. E. Coccidiosis of gallinaceous birds. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 1929, p. 269-383, 2005.

VENTURINI, C. G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S.L.], v. 375, n. 1-3, p. 200-208, fev. 2011.

ZHANG, Q. et al. Effect of threonine deficiency on intestinal integrity and immune response to feed withdrawal combined with coccidial vaccine challenge in broiler chicks. **British Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 116, n. 12, p. 2030-2043, 20 dez. 2016.

9 APÊNDICE

Apêndice 1

Resultados referentes a validação do método de quantificação do fármaco

O método de quantificação do toltrazuril foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV. Uma vez que Silva et al. (2015) descreveram que a acetonitrila é um dos solventes mais adequados para solubilizar o fármaco toltrazuril, este solvente foi selecionado para a preparação das soluções e para a extração do fármaco contido nas formulações.

Conforme a RDC 166/2017 a seletividade deve ser a capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse quando na presença dos demais componentes da formulação, como impurezas, diluentes e demais matérias-primas da formulação. O método mostrou-se seletivo (Figura 20), ou seja, nenhum dos componentes presentes na constituição das nanocápsulas poliméricas é detectado no comprimento de onda de análise no tempo de retenção do fármaco que é de 3,4 minutos.

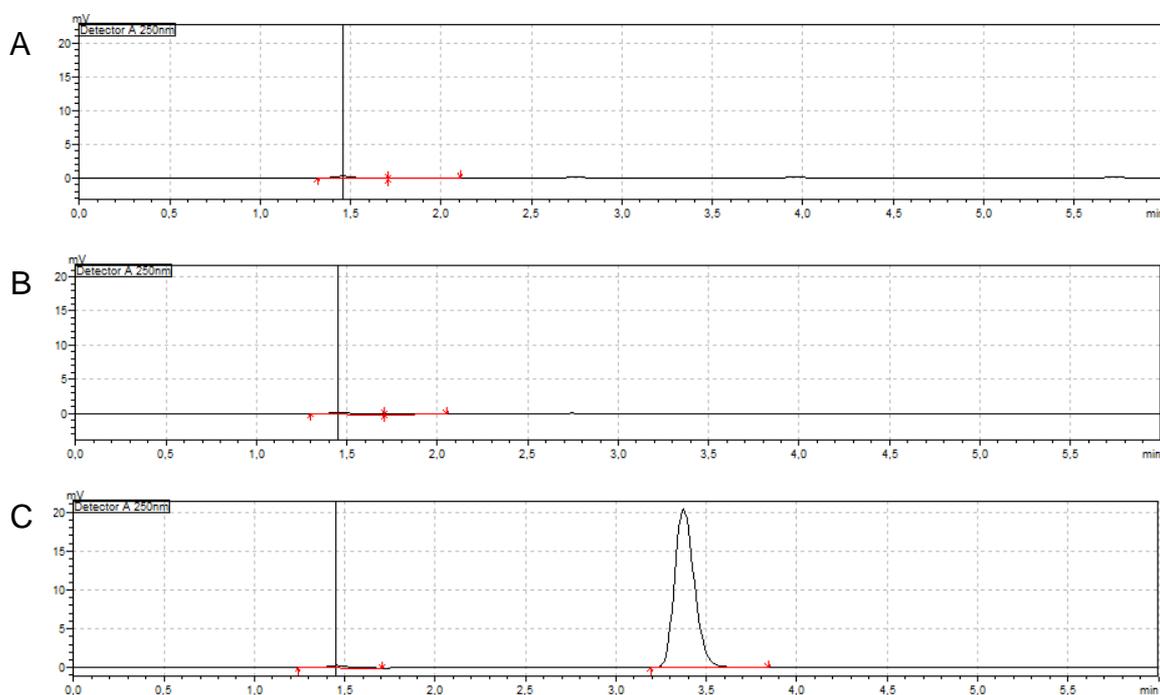


Figura 20. Cromatogramas obtidos a partir da análise de uma formulação de nanocápsulas (A) NC_{S100}, (B) LNC e (C) do fármaco livre, com comprimento de onda de análise de 250 nm e fase móvel de análise do toltrazuril.

O método demonstrou linearidade na faixa de concentração avaliada, entre 2,5 a 15 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9999 e equação $y=20146x+1808,7$ (Figura 21), corroborando com a literatura e permitindo análises de quantificação mais eficazes (SILVA et al., 2015).

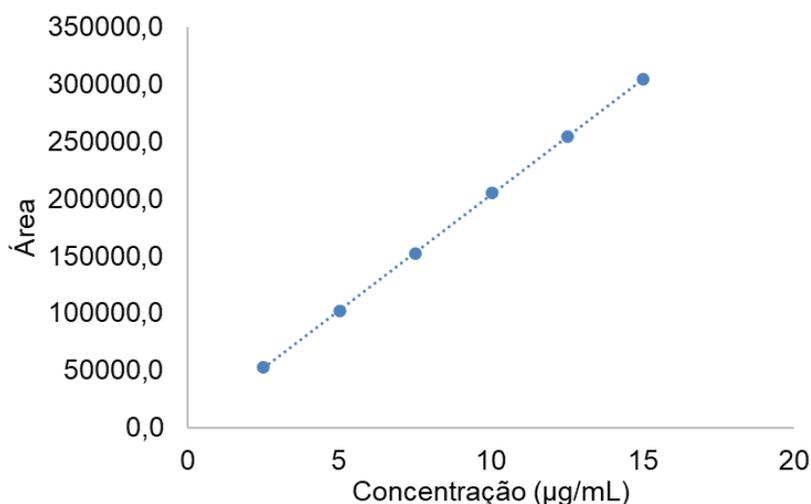


Figura 21. Média da curva padrão do toltrazuril (n=3) na faixa de concentração 2,5 a 15 µg/mL.

A análise estatística por ANOVA, análise de variância, tem a possibilidade de comparar a média de população amostral, identificando se essas médias diferem significativamente entre elas. Considerando que o F maior que 0,05 indica linearidade e o F de significação menor que 0,05 indica regressão significativa, a avaliação estatística por ANOVA mostrou desvio da linearidade não significativo e regressão linear significativa (Tabela 9).

Tabela 9. Análise estatística ANOVA da determinação de linearidade.

| Estatística de regressão | | | | | |
|---------------------------------|----------------------------|-------------|--|--|--|
| | R múltiplo | 0,999618685 | | | |
| | OR-Quadrado | 0,999237516 | | | |
| | R-quadrado ajustado | 0,99918986 | | | |
| | Erro padrão | 2526,31211 | | | |
| | Observações | 18 | | | |

| | gl | SQ | MQ | F | F de significação |
|------------------|-----------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|
| Regressão | 1 | 1,33823E+11 | 1,33823E+11 | 20968,03521 | 2,24437E-26 |
| Resíduo | 16 | 102116046 | 6382252,875 | | |
| Total | 17 | 1,33925E+11 | | | |

| | Coeficientes | Erro padrão | Stat t | valor-P |
|---------------------|---------------------|--------------------|---------------|----------------|
| Interseção | 1790,227305 | 1357,842706 | 1,318434969 | 0,205920714 |
| Variável X 1 | 20148,59733 | 139,1444694 | 144,8034365 | 2,24437E-26 |

| | 95% inferiores | 95% superiores | Inferior 95,0% | Superior 95,0% |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Interseção | -1088,27064 | 4668,725252 | -1088,270642 | 4668,725252 |
| Variável X 1 | 19853,62423 | 20443,57043 | 19853,62423 | 20443,57043 |

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas pelo método analítico a ser validado (RDC 166/2017). Assim, obteve-se um método preciso, com desvio padrão relativo (DPR) interdia de 0,86% para LNCt e 0,63% para NC_{S100t} e intradia de 1,04% para LNCt e 1,01% para NC_{S100t}. Ainda, mostrou-se exato, com recuperação de 103,25±0,71% de toltrazuril a partir da formulação LNCt e 102,71±0,46% para NC_{S100t}. O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado e o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada quantitativamente sob as condições experimentais estabelecidas (RDC 166/2017). Desta forma, o método apresentou limites de detecção e quantificação de 0,1084 µg/mL e 0,3284 µg/mL, respectivamente.

Apêndice 2

As Figuras 22, 23 e 24 apresentam as imagens de microscopia de um animal de cada grupo do duodeno, jejuno e íleo, respectivamente. As imagens apresentam as vilosidades, cripta e mucosa dos tecidos. Nas vilosidades, em azul, é possível observar a presença de células caliciformes, a quantidade dessas células é influenciada pelo tipo de tratamento ao qual os animais foram submetidos. Em roxo, observa-se a presença de diferentes formas de *Eimeria* (oocistos e gametas), em que a quantidade e grau de lesão tecidual também é influenciado pelo tratamento. Assim, verifica-se a alta quantidade de formas de *Eimerias* no grupo controle positivo (G2), no grupo tratado com LNCt 1,75 mg/Kg/dia (G6) e no grupo tratado com LNC (G7). Conseqüentemente, nesses mesmos grupos ocorreu a diminuição da quantidade de células caliciformes e diminuição na relação cripta:vilosidade.

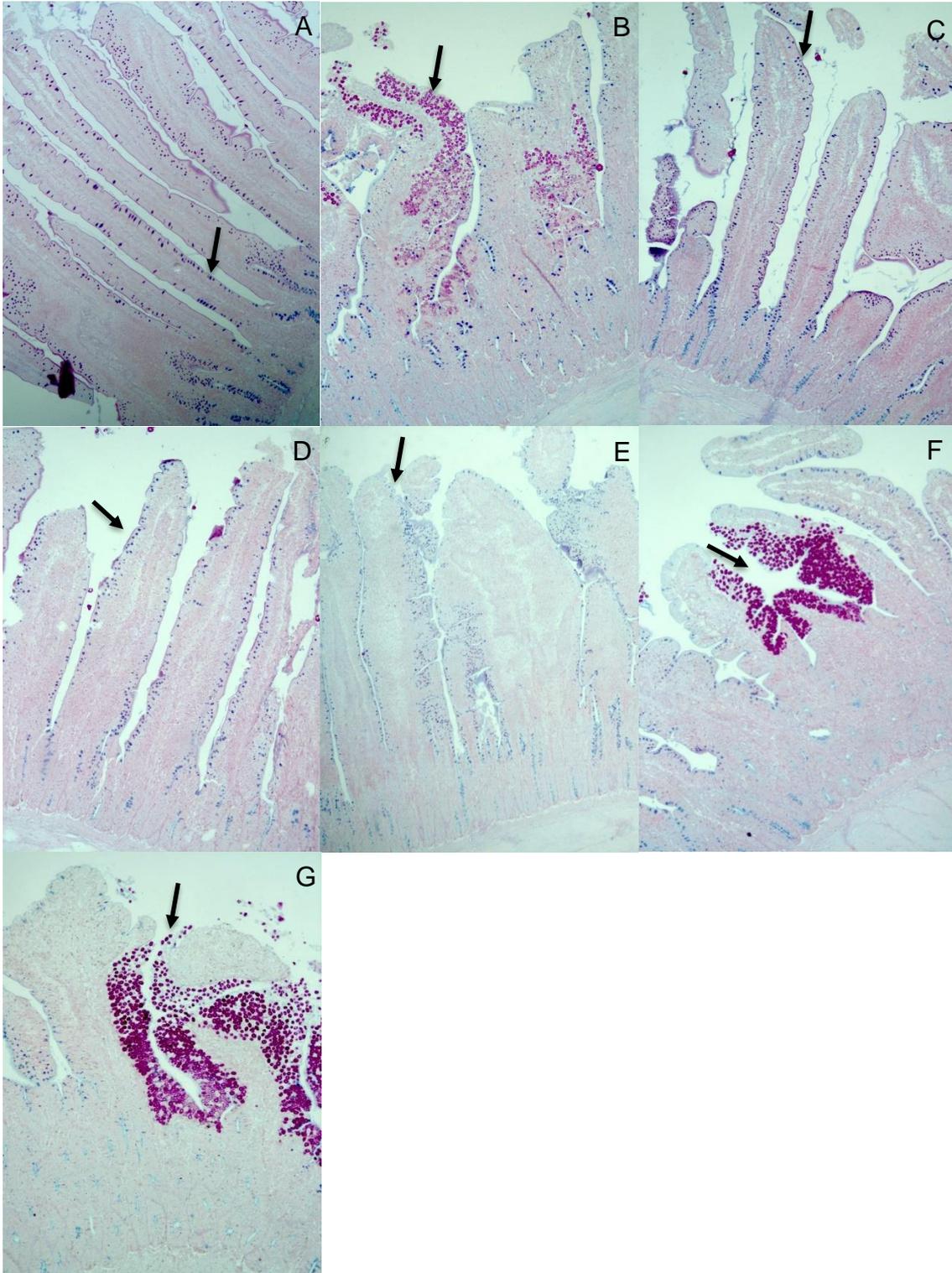


Figura 22. Imagens de microscopia do duodeno de um animal de cada grupo coradas com Alcian Blue + Fast Red. Aumento 200x. A: controle negativo; B: controle positivo; C: grupo tratado Baycox®; D: grupo tratado com LNCt 7 mg/Kg/dia; E: grupo tratado LNCt 3,5 mg/Kg/dia; F: grupo tratado LNCt 1,75 mg/Kg/dia e G: grupo tratado LNC.

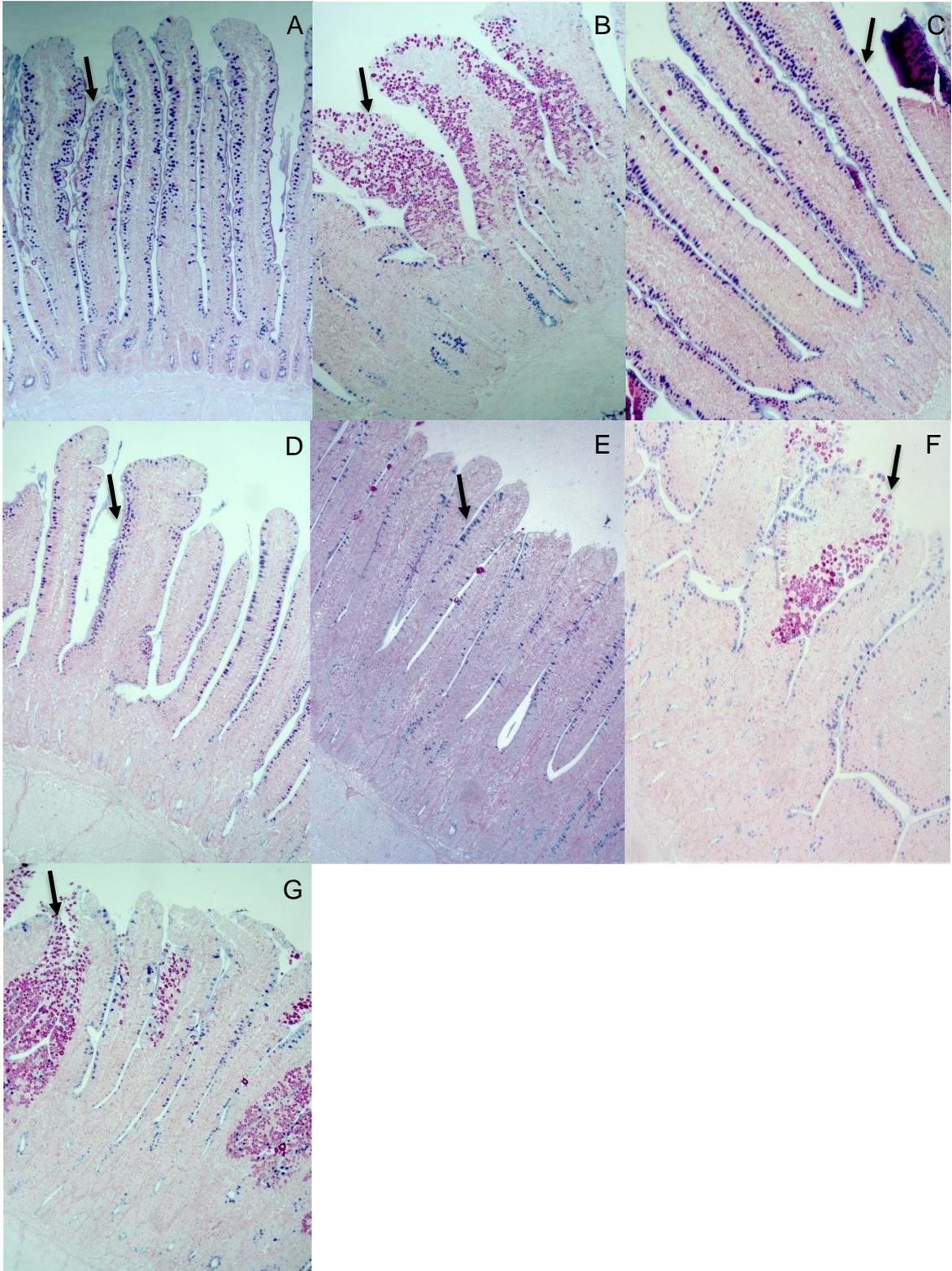


Figura 23. Imagens de microscopia do jejuno de um animal de cada grupo coradas com Alcian Blue + Fast Red. Aumento 200x. A: controle negativo; B: controle positivo; C: grupo tratado Baycox®; D: grupo tratado com LNCt 7 mg/Kg/dia; E: grupo tratado LNCt 3,5 mg/Kg/dia; F: grupo tratado LNCt 1,75 mg/Kg/dia e G: grupo tratado LNC.

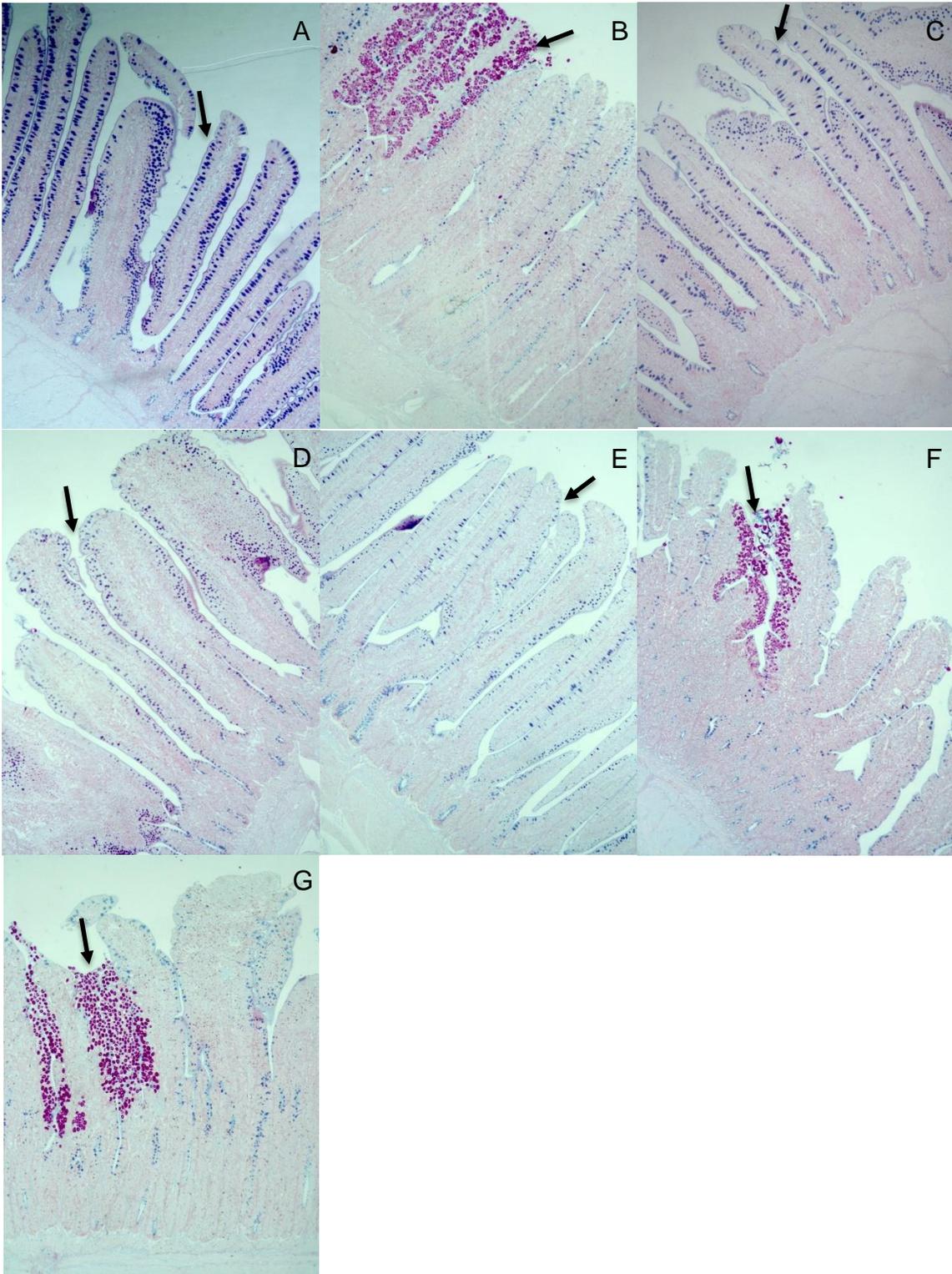


Figura 24. Imagens de microscopia do íleo de um animal de cada grupo coradas com Alcian Blue + Fast Red. Aumento 200x. A: controle negativo; B: controle positivo; C: grupo tratado Baycox®; D: grupo tratado com LNCt 7 mg/Kg/dia; E: grupo tratado LNCt 3,5 mg/Kg/dia; F: grupo tratado LNCt 1,75 mg/Kg/dia e G: grupo tratado LNC.

10 ANEXOS

Anexo 1

Parecer de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Embrapa Suínos e Aves

| | | |
|---|--------------|---------------------|
|  | Certificado* | ETICA 1/1 |
|---|--------------|---------------------|

*Em concordância com a Orientação Técnica CONCEA no 8, de 18 de março de 2016 (Anexo I)

Certificamos que a proposta intitulada **“Desenvolvimento e Avaliação de Nanomedicamento para Tratamento de Coccidiose em Frangos de Corte”**, registrada com o nº **002/2018**, sob a responsabilidade de **Francisco Noé da Fonseca** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO(A) Embrapa Suínos e Aves, em reunião de **18/01/2018**.

| | |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Vigência da Autorização | 02/01/2019 – 30/04/2022 |
| Espécie/linhagem/raça | <i>Gallus gallus</i> |
| Nº de animais | 200 |
| Peso/Idade | 35 gr/ 1 dia |
| Sexo | Machos/Fêmeas |
| Origem | Embrapa |


Paulo Augusto Esteves
CRB: 2563603D
Matrícula: 320571

Presidente CEUA/CNPSA

FQ4-053-13
Rev(01)