

Avicultura

INDUSTRIAL.COM.BR

ISSN 1516-3105

Nº 07|2022 | ANO 113 | Edição 1321 | R\$ 26,00

Gessulli
AGROMÍDIA
REFERÊNCIA E INOVAÇÃO



Conectada ao bem-estar animal e à sustentabilidade



Avicultura brasileira se mostra atenta a estas demandas estratégicas, ligando sua atividade a compromissos como os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU



CARLA MOLENTO

Com Novo Arranjo de Pesquisa e Inovação, Paraná investe em base tecnológica para ser referência em proteínas alternativas



SAÚDE ANIMAL

A nanotecnologia passa a ser vista como uma relevante ferramenta para o manejo da Coccidiose em frangos de corte

NANOTECNOLOGIA COMO FERRAMENTA PARA MANEJO DE COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE

A nanotecnologia aplicada a produtos veterinários é uma área emergente de pesquisa e desenvolvimento tecnológico, e que tem crescido significativamente nos últimos anos

Por | Ana Paula Bastos¹, Francisco Noé da Fonseca², Lana Flávia Baron³ e Karina Paese⁴

A Coccidiose é o termo usado para descrever uma doença entérica causada pela infecção com uma ou mais espécies de *Eimeria*. Esta 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 decorrentes das infecções por *Eimeria spp.* sejam em torno de US\$ 2,4-3 bilhões, sendo 76% deste montante devido às infecções (clínicas e subclínicas) e 24% relacionados aos gastos com tratamento (profilático ou terapêutico). No Brasil, um dos maiores produtores e exportadores de frangos de corte do mundo (14,3 e 4,6 milhões de toneladas, respectivamente em 2021), 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, 2022).

A etiologia desta doença entérica são espécies patogênicas de *Eimeria* que pertencem ao filo Apicomplexa, do gênero *Eimeria spp.* Foi relatado que mais de 1.000 espécies de *Eimeria* infectam diferentes animais hospedeiros, como frango, pato, peru, gado, coelho, ovelha, cão doméstico e gato. Em frangos, sete espécies foram descritas por infectar esses animais; sendo que as principais são *E. tenella*, *E. maxima* e *E. acervulina*. As espécies de *Eimeria* diferem na patogenicidade, incluindo a invasão de locais específicos do intestino e tipo de lesão produzida (FATOBA; ADELEKE, 2018). Em relação aos frangos de corte, as infecções por *Eimeria spp.* são responsáveis por grandes perdas na produção, pois reduzem o desempenho zootécnico do rebanho e, nos casos mais graves, levam à morte dos animais (FATOBA; ADELEKE, 2018). Vários fatores de risco estão envolvidos nos casos

de Coccidiose, como a alta densidade em aviários e o manejo inadequado das aves (GAZONI, 2015).

A doença clínica em frangos de corte inclui diarreia (de mucóide e aquosa a hemorrágica), redução no ganho de peso e ingestão de ração e, em casos graves, mortalidade. A maioria dos frangos são infectados com *Eimeria spp.* em algum momento de sua vida, mas apenas alguns desenvolverão manifestações clínicas da Coccidiose. Os sintomas clínicos tendem a ocorrer em animais jovens, mas ocasionalmente afetam adultos (FATOBA; ADELEKE, 2018). Por se tratar de um parasita amplamente distribuído no ambiente, diversas estratégias são utilizadas para seu controle, como o uso de medicamentos e vacinas, sendo a primeira abordagem a mais utilizada. O desafio com baixos níveis de *Eimeria spp.* pode estimular a resposta imune protetora do hospedeiro e esta é a base das estratégias de vacinação. Normalmente, os medicamentos são incorporados na ração ou na água e são fornecidos durante todo o ciclo de produção dos frangos de corte, no entanto, o problema dessa estratégia é o surgimento de isolados de *Eimeria spp.* resistentes aos coccidiostáticos (FATOBA; ADELEKE, 2018). Além disso, resíduos de medicamentos veterinários em produtos avícolas podem ser transmitidos aos seres humanos através do consumo de carne contaminada. A baixa e contínua exposição aos antimicrobianos desencadeia diversas implicações patológicas que são consideradas importantes problemas de saúde pública (MUND *et al.*, 2018). Esses fatores têm chamado a atenção do setor produtivo, estimulando a busca por novas abordagens para o manejo dessa parasitose.

NANOTECNOLOGIA COMO ALTERNATIVA

A nanotecnologia aplicada a produtos veterinários é uma área emergente de pesquisa e desenvolvimento tecnológico, e que tem crescido significativamente nos últimos anos. Diferentes nanossistemas têm sido investigados para terapia animal, reprodução, nutrição, etc. (EL-SAYED *et al.*, 2018). A nanoencapsulação de fármacos é uma alternativa promissora para a terapêutica, pois apresenta a vantagem

de melhorar o efeito biológico dos fármacos, reduzindo o número de doses administradas e possíveis efeitos tóxicos (SANDRI *et al.*, 2019).

Em relação à Coccidiose, quase não há relatos na literatura sobre o uso de sistemas nanoestruturados como estratégia terapêutica contra a infecção por *Eimeria spp.* Os estudos se concentraram essencialmente em nanomateriais inorgânicos como zinco (DKHIL; AL-QURAIHY; WAHAB, 2015) ou prata (CHAUKE *et al.*, 2012). No entanto, de acordo com estes estudos, os nanomateriais inorgânicos apresentaram potencial limitado devido à menor eficácia em relação aos agentes terapêuticos usuais e resíduo de carcaça, que enfrentaria problemas regulatórios para uso, respectivamente. Ao contrário, as nanopartículas poliméricas são interessantes para esse fim, pois os materiais utilizados são biocompatíveis e podem ser biodegradáveis, e as propriedades físico-químicas podem ser moduladas de acordo com o uso final. Outra grande vantagem do uso desses nanopartículas é a possibilidade de reduzir a dose do princípio ativo administrada sem afetar a eficácia terapêutica (POHLMANN *et al.*, 2013).

Portanto, considerando que o Brasil é um dos líderes mundiais na produção de frangos de corte e a tendência mundial de redução/retirada do uso de antimicrobianos na produção animal, a nanoencapsulação de anticoccidianos é uma alternativa promissora para o manejo dessa parasitose, agregando valor à cadeia produtiva da avicultura.

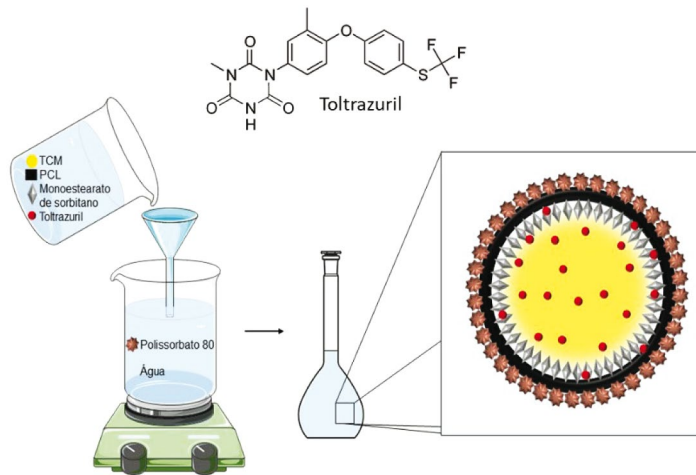
PESQUISA EM ANDAMENTO

Levando em consideração todo esse cenário, a Embrapa Suínos e Aves, em parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, vem conduzindo um projeto que visa desenvolver uma alternativa de profilaxia e de tratamento para a Coccidiose em frangos de corte.

Neste projeto, foi utilizado o fármaco modelo Toltrazuril (amplo espectro de ação), o qual foi nanoencapsulado pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (Figura 01) (FESSI *et al.*, 1989), empregando o polímero poli-ε-caprolactona (LNCT). Para fins comparativos foi preparada uma formulação branca, sem fármaco, nas mesmas condições (LNC). Posteriormente as formulações foram caracterizadas físico-quimicamente e avaliadas quanto à estabilidade. A formulação desenvolvida apresentou características nanotecnológicas adequadas, como diâmetro, potencial zeta e teor, além de se mostrar estável química e fisicamente e apresentar grande capacidade de associar fármaco sem a presença de nanocristais.



Figura 01. Esquema de preparação por deposição interfacial de polímero pré-formado de nanocápsulas poliméricas contendo Toltrazuril. Uma solução orgânica contendo polímero, tensoativo não iônico de baixo EHL, óleo e fármaco é injetada em uma solução aquosa de tensoativo não iônico de elevado EHL. Na figura em destaque, devido às características físico-químicas do Toltrazuril, este encontra-se disperso no núcleo oleoso das nanocápsulas



Ainda, durante o desenvolvimento de novos nanossistemas de liberação de fármacos, é importante estabelecer a segurança da nanoformulação proposta antes da administração em animais, sendo os ensaios de viabilidade celular, incluindo diferentes marcadores, as técnicas mais comuns para esse fim. Assim, considerando que a nanoformulação é destinada à administração em aves, a viabilidade celular da linhagem CEC-12, que consiste em fibroblastos de galinha imortalizados, foi determinada por diferentes técnicas. A incubação por 24h, 48h e 72h não danificou a membrana celular, uma vez que a taxa de viabilidade foi superior a 80% independentemente da concentração (35,25-141,00 μM) e do tempo de tratamento estudados. Em relação à metodologia que visa avaliar a integridade do material genético, não se observou dano nos mesmos tempos de tratamento (viabilidade >90%) em uma faixa mais ampla de concentrações (14,69-470,00 μM). Em geral, os resultados *in vitro* foram promissores, uma vez que a formulação LNCt foi considerada não citotóxica para fibroblastos aviários, independente da dose avaliada, do tempo de tratamento ou da metodologia de avaliação.

Nesse sentido, a fim de avaliar a atividade profilática em frangos de corte deste novo sistema de entrega de fármacos, foram utilizados 70 pintainhos, (*Gallus gallus*), ambos

os sexos, linhagem COBB, os quais foram mantidos em isoladores apropriados ($n= 10$ animais/grupo), com acesso a água e ração à vontade. O desafio consistiu em administrar cistos de *Eimeria* para desencadear, experimentalmente, uma infecção pelo parasita nas aves (ZHANG *et al.*, 2016). Durante o experimento, os animais foram pesados (dia 1, 13, 16 e 21), e ainda se acompanhou o consumo de ração.

As aves receberam no 13^o e 14^o dias de vida diferentes doses de Toltrazuril nanoencapsulado (LNCt 1,75, 3,5 e 7 mg/kg/dia) (G4, G5 e G6, respectivamente) por meio da diluição adequada da formulação no bebedouro dos isoladores. Para fins comparativos, foram avaliadas a formulação branca (sem fármaco, LNC, no volume equivalente a maior concentração do tratamento com LNCt) (G7) e o medicamento de referência

(Toltrazuril, 7 mg/kg/dia) (G3). Ainda, foram incluídos grupo controle positivo (infectado e não tratado) (G2) e grupo controle negativo (não infectado) (G1). No 16^o dia, os animais foram desafiados com os cistos de *Eimeria* (vacina Fortegra[®]/MSD, utilizando 20x a dose normal da vacina) e no 21^o dia os animais foram necropsiados, com realização de análise macroscópica de intestinos, fígado e rim, que foram posteriormente coletados e tratados para análise histopatológica, contagem de oocistos, quantificação de imunoglobulinas, qPCR e avaliação de morfometria do tecido intestinal.

A administração da vacina produziu as lesões específicas para todas as cepas (menor extensão para *E. tenella*) nas aves desafiadas não tratadas (G2, controle positivo), e um resultado semelhante foi encontrado para LNC (G7). Em contraste, o tratamento com o medicamento de referência (Toltrazuril, G3) não resultou em alterações significativas no intestino. Quanto à nanoformulação, os tratamentos G4, G5 e G6 apresentaram lesões leves.

Nas análises histopatológicas do intestino delgado (duodeno, jejuno e ílio) e ceco não foram observadas lesões óbvias no grupo G1 (animal não desafiado). Ao contrário, sangramento (leve a moderado) no intestino delgado e no ceco foi detectado em todos os grupos desafiados (G2,

G3, G4, G5, G6 e G7), indicando que as aves do presente estudo apresentaram infecção coccidiana moderada/grave. Aves não tratadas e desafiadas (G2) e aves tratadas com nanoformulação sem fármaco (G7) apresentaram lesões moderadas a graves (escore 3-4). A administração de Toltrazuril (G3, G4, G5 e G6) reduziu significativamente ($p < 0,05$) as lesões no intestino delgado em relação ao controle positivo, porém, uma menor redução na gravidade das lesões foi observada para a menor dose de LNcT (G6). No ceco, a gravidade da lesão foi heterogênea entre os grupos, ainda a administração de Toltrazuril (G3, G4 e G5) pareceu melhorar as lesões.

Na avaliação histomorfométrica dos intestinos de uma galinha saudável, espera-se que a razão altura de vilosidade:profundidade de cripta (VH:CD) seja de pelo menos 5 (cinco partes de vilosidade por uma parte da cripta) (RUANGPANIT *et al.*, 2020), como observado em G1. No presente estudo, a descamação epitelial foi observada em galinhas desafiadas não tratadas (G2) e tratadas com formulação sem fármaco (LNC, G7). A administração de Toltrazuril (G3) antes do desafio levou a uma melhora significativa na relação VH:CD duodenal ($p < 0,05$) em relação ao G2 (controle positivo), assim como o tratamento com LNcT (G4, G5) para ambos razão VH:CD duodenal

e jejunal ($p < 0,05$). Curiosamente, não foi observado aumento significativo da razão no íleo para G3 e G4, apesar de numericamente superior ao controle positivo (G2). No geral, o tratamento com formulações à base de Toltrazuril (G3, G4 e G5) aumentou a relação VH:CD no duodeno e parcialmente no jejuno.

As células caliciformes são responsáveis pela secreção de mucinas que constituem a camada de muco, que atua como barreira física e apresenta funções imunológicas para inibir a entrada de patógenos nas células epiteliais (REYNOLDS *et al.*, 2020). A infecção por Coccidiose reduz a densidade de células caliciformes no intestino, afetando o desenvolvimento e o desempenho das aves. No presente estudo, a dose de desafio reduziu significativamente ($p < 0,05$) cerca de 50% da quantidade de células caliciformes nas galinhas não tratadas (G2) em comparação às não desafiadas (G1) em todos os segmentos do intestino delgado (Figura 02). Isso é semelhante ao que ocorreu com as aves tratadas com LNC (G7), mostrando que o próprio nanocarreador não teve efeito protetor contra infecção por *Eimeria ssp.* O tratamento precoce com Toltrazuril (G3) e LNcT (G4 e G5) evitou significativamente a redução das células caliciformes ($p < 0,05$) quando comparado ao controle

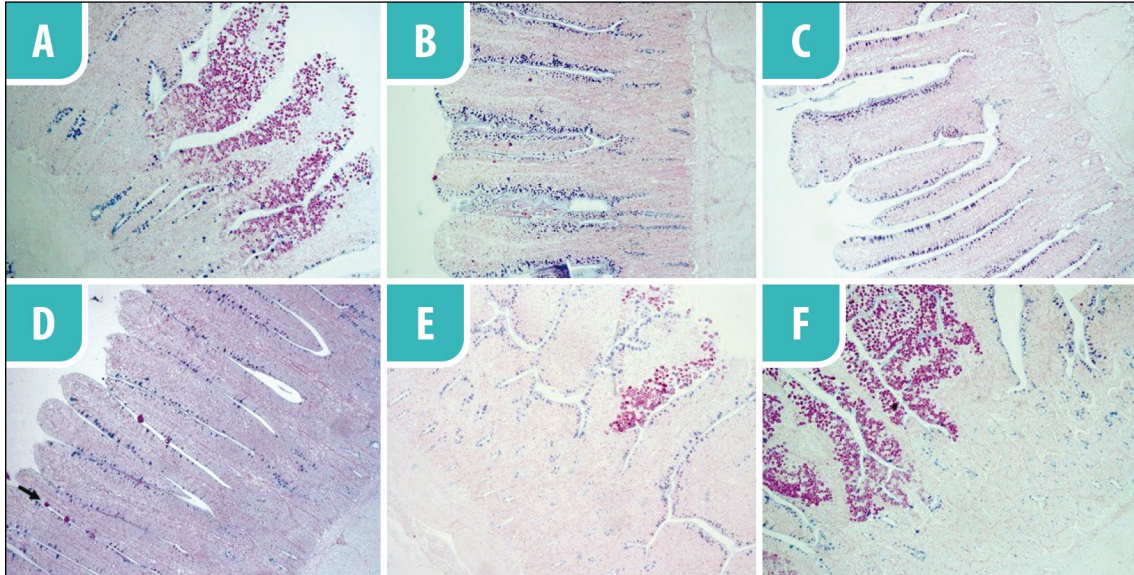
NUTRIÇÃO ANIMAL DE QUALIDADE

SOLUÇÕES SUPERIORES
TAMBÉM SE CONSTROEM
COM CONFIANÇA.

Investimos em tecnologia e
segurança para que você possa
confiar em nossa qualidade.

Ao longo dos últimos 35 anos, a Quimtia trabalha para desenvolver e aperfeiçoar soluções em **NUTRIÇÃO ANIMAL** para diversas espécies. Com presença global e sedes no Brasil, Peru, Argentina, Colômbia, Chile e México, garante credibilidade por meio de uma atuação séria e focada em oferecer resultados que superam expectativas.

Figura 02. Intestino delgado corado com Hematoxilina e PAS. (A) controle positivo. (B) Toltrazuril (7 mg/kg/dia), (C) LNct (7 mg/kg/dia), (D) LNct (3,5 mg/kg/dia) e (E) (1,75 mg/kg/dia). (F) LNC (volume equivalente a LNct 7 mg/kg/dia): intestino apresentando contaminação grave por *Eimeria* spp. Ampliação, 100X



positivo (G2), marcadamente no duodeno, com leve e menor efeito no jejunum e íleo, respectivamente.

A administração de nanocápsulas (LNC e LNct), bem como o Toltrazuril não alterou a ingestão alimentar e hídrica, pois não foi observada diferença no desenvolvimento de peso em relação ao grupo controle negativo (G1). Considerando a contagem de oocistos, como esperado, nenhuma contagem de OPG foi observada antes do desafio; por outro lado, as contagens de oocistos de *Eimeria* aumentaram 2 dias após o desafio no grupo desafiado não tratado (G2), o que poderia explicar a rápida aquisição de imunidade ativa, como IgA e IgM (TAYLOR; CATCHPOLE, 1994). Além disso, os animais tratados com Toltrazuril apresentaram excreção insignificante de oocistos, o que foi confirmado por qPCR de *Eimeria* spp., sendo possível detectar DNA de *Eimeria* nos grupos tratados, embora em quantidades baixas. Um aspecto importante a ser destacado é que não houve amplificação de *Eimeria* no G1 (controle negativo), evidenciando que não ocorreu contaminação cruzada no experimento.

Em relação à análise da mucosa, o sistema imunológico neste local do intestino enfrenta o desafio de eliminar potenciais patógenos, mantendo uma relação mutuamente benéfica com a microbiota comensal. A IgM é o

isotipo predominante produzido após a exposição inicial a um novo antígeno, enquanto os anticorpos secretores da classe IgA (SIgA) representam a primeira linha de defesa imunológica antígeno-específica no lúmen intestinal. Embora a SIgA ainda não tenha demonstrado qualquer ação protetora em galinhas durante a Coccidiose (Girard, *et al.*, 1997), o desafio (sobredosagem da vacina coccidiana) pode afetar a função de barreira imunológica da mucosa intestinal. A infecção por *Eimeria* estimula a imunidade humoral, portanto, o aumento da produção de imunoglobulinas (IgA e IgM) é maior na área parasitada (duodeno) (Girard, *et al.*, 1997; TREES *et al.*, 1995; LILLEHOJ and JAMES, 1996) e os níveis de anticorpos estão relacionados com a gravidade da infecção (ONAGA *et al.*, 1986), bem como com o nível de exposição ao parasita (GILBERT *et al.*, 1988). O tratamento com Toltrazuril nos grupos infectados (Toltrazuril e LNct) preveniu ou reduziu a infecção por *Eimeria* nas aves, conforme descrito nos achados de OPG e qPCR. Os grupos infectados-tratados apresentaram menor infecção e, conseqüentemente, menor produção de imunoglobulinas, quando comparados aos animais do grupo infectado não tratado (controle positivo).

Considerando a eficácia na profilaxia da infecção por *Eimeria* spp. quanto aos parâmetros histopatológicos,

os grupos G4 e G5 (7 e 3,5 mg/kg/dia, respectivamente) apresentaram lesões macroscópicas leves, semelhantes ao G3 (Toltrazuril, 7 mg/kg/dia). Além disso, corroborando esses resultados, a análise histológica no intestino delgado e ceco indica que os escores das lesões foram semelhantes entre estes três grupos. Foi observado também que os diferentes tratamentos avaliados não afetaram o ganho de peso nem o consumo de ração ao longo de todo o período de análise. Esses achados sugerem que a nanoencapsulação do Toltrazuril possibilitou reduzir pela metade sua dose para o tratamento da Coccidiose, uma vez que a mesma resposta foi observada em comparação ao medicamento de referência. Os resultados no presente estudo apontam para uma nova alternativa de tratamento preventivo de Coccidiose em frangos de corte, apresentando a possibilidade de desenvolvimento de formulações contendo outros fármacos anticoccidianos. Nesse contexto, até onde sabemos, este é o primeiro relato que avaliou nanocápsulas poliméricas contendo um fármaco anticoccidiano (Toltrazuril), sendo uma abordagem promissora para o controle profilático de infecção de *Eimeria ssp.* em aves.

PERSPECTIVAS

A nanoencapsulação de fármacos anticoccidianos mostra-se como uma estratégia promissora, uma vez que viabiliza a redução da dose de tratamento sem afetar o efeito antiparasitário nas aves em relação aos medicamentos de referência. Com relação à pesquisa em andamento com o Toltrazuril, o novo nanossistema de liberação desenvolvido foi eficiente na profilaxia de Coccidiose em aves, e novos experimentos estão em andamento para avaliar o efeito terapêutico, ou seja, em aves já contaminadas sendo tratadas com o nanomedicamento. Além disso, essa plataforma proposta de nanoencapsulamento de fármacos, ou outros ativos de interesse, abre possibilidades para avançar o manejo de doenças de aves, que não respondem tão bem às ferramentas terapêuticas convencionais disponíveis. ⁴⁰

¹Médica Veterinária, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, e-mail: ana.bastos@embrapa.br

²Farmacêutico, analista da Embrapa Sede, e-mail: francisco.fonseca@embrapa.br

³Farmacêutica, responsável técnica da Farmácia Villa Farma, e-mail: lanafaviabaron@hotmail.com

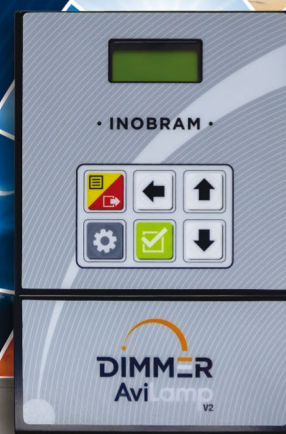
⁴Farmacêutica, professora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e-mail: karina.paese@ufrgs.br



As Referências Bibliográficas deste artigo podem ser obtidas no site de Avicultura Industrial por meio do link: www.aviculturaindustrial.com.br/nanotecnologia1321

Na sua granja,
quem controla

o dia e
a noite
é **você!**

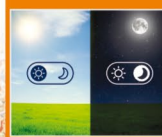


NOVO

Dimmer AviLamp V2.
Parceiro na produtividade
da sua granja.

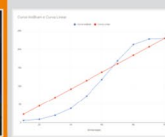
Controle inteligente de acionamento de lâmpadas

Configure de acordo com a necessidade do seu lote.



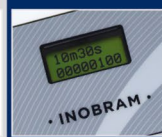
EXCLUSIVO Sistema de Curvas de Dimerização InoBram

Mais precisão no brilho mínimo e máximo.



Sistema de relatórios no visor do equipamento

SOBRETENSÃO
SOBRECORRENTE
RELIGAMENTO



SAIBA MAIS SOBRE O Dimmer AviLamp V2.

ACESSE: >>>



inoBram
AUTOMAÇÕES