

NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CARREGADAS DE TOLTRAZURIL COMO ABORDAGEM PARA O CONTROLE TERAPÊUTICO DA COCCIDIOSE EM AVES

Ana Paula A. Bastos¹, Karine Paese², Franciana A Volpato³,
Lana Flávia Baron², Vanessa Gressler¹, Adriana Mércia G Ibeli¹,
Marcos Antônio Z Mores¹, Francisco Noé Fonseca¹

¹ Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, Santa Catarina, Brasil;

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

³ Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia

ABSTRACT/RESUMO

Pharmaceuticals' biological effects can be enhanced via nanotechnology, resulting in decreased administered doses and deleterious effects. As a consequence, to prevent coccidiosis in broiler poultry, toltrazuril-loaded polymeric nanoparticles based on poly- ϵ -caprolactone (LNCT) were developed. The synthesized nanoformulations exhibited a consistent distribution of particle diameters within the nanometer range (z-mean and D (4.3) <200 nm), a negative zeta potential (<-8.93 mV), a drug content of approximately 100%, and an encapsulation efficiency exceeding 90%. Chickens were subsequently treated with LNCT for therapeutic purposes after being challenged with *Eimeria* oocysts. Assessment of the small intestine and cecum revealed that administration of LNCT (1.75 mg/kg/day) in potable water resulted in comparable reductions in oocyst excretion and lesion scores as the reference medication containing toltrazuril (7 mg/kg/day). In broilers, the current investigation demonstrates the potential efficacy of nanoencapsulated anticoccidial pharmaceuticals as a preventative measure against coccidiosis.

PALAVRAS-CHAVE: EIMERIA SPP.,
NANOCAPSULAS POLIMÉRICAS, EIMERIOSE

INTRODUÇÃO

Nas aves, as infecções por *Eimeria* spp. (*E. tenella*, *E. mitis*, *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. necatrix* e *E. praecox*) são responsáveis por perdas econômicas importantes, pois reduzem o desempenho zootécnico e, nos casos mais graves, levam à morte das aves (Fatoba and Adeleke, 2018). Por se tratar de um parasita amplamente distribuído no meio ambiente, diversas estratégias são utilizadas para seu controle, como o uso de anticoccidianos e vacinas. A exposição baixa e contínua a antimicrobianos desencadeia diversas implicações consideradas importantes problemas de saúde pública, como o surgimento de isolados de *Eimeria* spp. resistentes a medicamentos (Mund et al., 2017). Além disso, resíduos de medicamentos veterinários em produtos avícolas podem ser transmitidos aos seres humanos através do consumo de carne contaminada. Esses fatores têm chamado a atenção do setor produtivo, estimulando a busca por novas abordagens no manejo dessa parasitose. A nanoencapsulação de medicamento é uma alternativa promissora aos tratamentos convencionais porque é possível melhorar o efeito biológico dos medicamentos, reduzindo o número de doses administradas e possíveis efeitos tóxicos (Baron et al., 2022). Esse trabalho teve como objetivo desenvolver nanocápsulas poliméricas contendo toltrazuril (medicamento anticoccidiano de amplo espectro) para o terapêutica de *Eimeria* spp. infecção em frangos de corte, para que a liberação do fármaco pudesse ser controlada e a resposta biológica ao tratamento pudesse ser melhorada, levando, conseqüentemente, à redução da dose eficaz.

MATERIAL E MÉTODOS

As nanocápsulas poliméricas foram preparadas usando o método de deposição interfacial de polímero pré-formado, conforme descrito em nosso estudo anterior (Baron et al., 2022). Resumidamente, uma fase orgânica contendo o polímero (PCL 100, 200 mg), acetona, etanol, óleo (CCT), monoestearato de sorbitano e toltrazuril (ChemCruz) foi injetado em fase aquosa contendo polissorbatos 80, sob agitação

magnética. A suspensão foi concentrada sob pressão reduzida de modo que a concentração final de toltrazuril foi de 1,00 mg/mL. As formulações preparadas com PCL foi denominadas LNCT. Formulações em branco (sem fármaco) também foram preparadas e denominadas LNC. Os tamanhos das partículas e as distribuições de tamanho foram determinados por difração a laser ($n = 3$). O diâmetro hidrodinâmico médio das partículas (média z) e o índice de polidispersidade (PDI) foram determinados utilizando espalhamento dinâmico de luz (DLS) (ZetaSizer Nano ZS). A morfologia das formulações foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM, Jeol 1200 ExII) a 80 kV. O conteúdo de toltrazuril nas nanocápsulas foi determinado por cromatografia líquida. A eficiência de encapsulamento (EE%) foi determinada com base na diferença entre a concentração total e livre do fármaco. A presença de nanocristais foi avaliada por rastreamento de nanopartículas (NTA) (NanoSight LM10). A estabilidade das formulações expostas ao fluido gastrointestinal simulado foi feito pelo método de Boisen e Fernández e a citotoxicidade foi analisada em fibroblastos de frango por MTT e com o kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity (Invitrogen™) por citometria de fluxo. Pintainhos (linhagem COBB, 1 dia de idade, ambos os sexos, 40-45 g) foram pesados e divididos em 7 grupos (10 aves/grupo) e alocados para garantir peso inicial semelhante em cada grupo. Os pintinhos eram inspecionados diariamente em busca de quaisquer problemas de saúde, e a mortalidade era registrada como ocorreu. Os grupos foram os seguintes: (G1) água potável (AP) (controle negativo); (G2) AP + desafio (controle positivo); (G3) AP + aditivo Baycox® (7 mg/Kg/dia) + desafio; (G4) AP + LNCT (7 mg/Kg/dia) + desafio; (G5) AP + LNCT (3,5 mg/Kg/dia) + desafio; (G6) AP + LNCT (1,75 mg/Kg/dia) + desafio; (G7) AP + aditivo LNC (nano branca) + desafio. Aos 15 dias de idade as aves foram desafiadas e aos 16-17 dias de idade, as aves receberam diferentes doses de LNCT (G4, G5 e G6) em água, bem como a formulação branco (G7-LNC, equivalente ao volume da maior dose de LNCT) e Baycox® (G3 – medicamento comercial, 7 mg/kg/dia). Os grupos controle (G1 e G2) receberam

apenas água. O desafio consistiu na administração *E. acervulina* (62.500 oocistos/ave) + *E. maxima* (40.000 oocistos/aves) e *E. tenella* (12.500 oocisto/aves). Cinco dias após o desafio, foram avaliadas lesões intestinais, quantidade de oocistos nas fezes, permeabilidade gastrointestinal e análise residual de toltrazuril e metabólitos em peito e sobrecoxa de frango.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as formulações (LNCT) foram preparadas com sucesso seguindo a metodologia proposta e consistiam em um líquido branco opalescente com coloração azulada devido ao efeito Tyndall, indicando a presença de estruturas coloidais (partículas nanométricas). Em relação ao perfil de distribuição granulométrica, o LNCT apresentou distribuição monomodal homogênea na faixa manométrica (z-mediana e D (4,3) <200 nm). Quanto à dispersão dos valores do diâmetro (span), a formulação apresentou distribuição homogênea de diâmetro de partículas (1,3 a 1,5). Para os valores da média Z e do PDI, a inclusão do medicamento não levou a uma diferença significativa entre a formulação branca ou carregada. A formulação LNCT apresentou potencial Zeta negativo (<-8,93 mV), conteúdo de fármaco ~100% e eficiência de encapsulamento >90% e um pH variando de 4 a 5, indicando sua compatibilidade para uso oral. Os parâmetros físico-químicos obtidos estão em conformidade com outras nanoformulações semelhantes relatadas (Baron et al., 2022). Ensaios de viabilidade celular mostraram que o nanomedicamento LNCT não apresentou toxicidade relevante até 72 horas. LNCT foi então administrado terapêuticamente em frangos após o desafio com oocistos de *Eimeria* spp. Nenhum oocisto foi detectado nas excretas das galinhas não desafiadas (G1), já nas aves tratadas (7 mg/kg/dia) com Baycox® (G3) e

LNCT (G4, G5 e G6) observou presença de oocistos em quantidade variável, mas foi zerado com 3 dias após os tratamentos. Quantificação de DNA nas excretas, não houve detecção para o grupo não desafiado (G1), enquanto a detecção para os demais grupos aumentou do dia 16 para o 17. O desafio com *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* produziu as lesões específicas para todas as cepas nas aves desafiadas não tratadas (G2, controle positivo), e resultado semelhante foi encontrado para LNC (G7). Em contrapartida, o tratamento com medicamento comercial (Baycox®, G3) resultou em alterações leves macroscópicas no intestino. Apesar de que os tratamentos LNCT (G4, G5 e G6) apresentaram lesões leves a moderadas. Na avaliação microscópica e histomorfométrica do intestino delgado e ceco observamos que o tratamento com LNCT (1,75mg/kg/dia) reduziu os escores de lesões e a excreção de oocistos, semelhante ao medicamento de referência contendo toltrazuril (Baycox®, 7 mg/kg/dia) no segundo dia de tratamento.

No íleo, a concentração de IgM e IgA apresentou aumento nos grupos desafiados em comparação ao grupo negativo, exceto no grupo tratado com LNCT 7mg/kg (G4). Na análise LC-MS/MS de Toltrazuril e metabólitos entre as amostras investigadas, apenas a TOL-sulfona foi detectada. Ressalta-se que as concentrações encontradas no G3 e G4 foram acima do limite máximo de resíduos (LMR) estabelecido pela legislação brasileira (LMR de 100 µg/kg, Anvisa, 2018), porém neste estudo o tempo de retirada recomendado (18 dias) não foi seguido, portanto já era esperada uma concentração maior. Nos grupos tratados com a LNCT (G5 e G6) não foi detectado toltrazuril e seus metabólitos. O presente estudo mostra o potencial uso protetor de medicamentos anticoccidianos nanoencapsulados como uma abordagem promissora para o controle da coccidiose em aves.

CONCLUSÃO

Nossos achados sugerem que a nanoencapsulação do toltrazuril permitiu reduzir 75% (LNCT- 1,75mg/kg) sua dose para o tratamento da coccidiose, uma vez que a mesma resposta foi observada em comparação com o medicamento de referência.

BIBLIOGRAFIA

Baron, L.F., Fonseca, F.N.D., Maciag, S.S., Bellaver, F.A.V., Ibeli, A.M.G., Mores, M.A.Z., Almeida, G.F.D., Guterres, S.S., Bastos, A.P.A., Paese, K., 2022.

Toltrazuril-Loaded Polymeric Nanocapsules as a Promising Approach for the Preventive Control of Coccidiosis in Poultry. *Pharmaceutics* 14.

Fatoba, A.J., Adeleke, M.A., 2018. Diagnosis and control of chicken coccidiosis: a recent update. *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology* 42, 483-493.

Mund, M.D., Khan, U.H., Tahir, U., Bahar-E-Mustafa, Fayyaz, A., 2017. Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: A review. *Int J Food Prop* 20, 1433-1446.