

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR FRENTE A UM NANOMEDICAMENTO PARA TRATAMENTO DE COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE

Lana F. Baron¹, Ana P. A. Bastos², Rovian Miotto³, Francisco N. da Fonseca⁴ e Karina Paese⁵

¹Mestranda no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – UFRGS
lanafaviabaron@outlook.com

²Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves

³Graduando de Medicina Veterinária – UPF

⁴Analista da Embrapa Suínos e Aves

⁵Professora do Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFRGS

Palavras-chave: nanotecnologia, coccidiose, toltrazuril.

INTRODUÇÃO

A coccidiose é uma doença causada por protozoários intracelulares principalmente do gênero *Eimeria* que afetam o trato intestinal dos animais de produção, sendo responsáveis por grandes perdas econômicas no setor agropecuário. Usualmente, os fármacos são incorporados na água e são fornecidos durante todo o ciclo produtivo das aves. 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 contaminadas. Neste contexto, a nanotecnologia, por meio de nanocarreadores de fármacos, mostra-se uma alternativa interessante 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 (Brandão et al., 2011; Jabir et al., 2012). Logo, considerando que o Brasil é um dos líderes mundiais da produção de frangos de corte e no sentido de agregar valor à cadeia produtiva de insumos agropecuários, o presente estudo tem por objetivo avaliar a viabilidade celular frente a um nanomedicamento para o tratamento de coccidiose aviária.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado o fármaco toltrazuril (amplo espectro de ação), o qual foi nanoencapsulado pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (Fessi et al., 1989), empregando os polímeros poli-ε-caprolactona (LNCt) ou Eudragit® S100 (NCt). Para fins comparativos, formulações brancas, sem fármaco, também foram preparadas nas mesmas condições (NC e LNC). Posteriormente as formulações foram caracterizadas físico-quimicamente quanto ao diâmetro, homogeneidade na distribuição de diâmetro, potencial zeta, pH, teor e taxa de associação, com prévia validação do método analítico.

O cultivo celular foi realizado com as células CEC-32 (linhagem celular de fibroblasto aviário), incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂ e meio DMEM low (Gibco). As nanoformulações e o fármaco livre foram aplicadas aos poços e a viabilidade celular foi analisada nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h.

As células tratadas com as formulações foram avaliadas pelo kit *LIVE/DEAD*® (Invitrogen), uma metodologia que se baseia na determinação simultânea de células vivas e mortas através de parâmetros de viabilidade celular como a atividade da esterase intracelular e integridade da membrana plasmática, empregando os componentes fluorescentes marcadores celulares A (calceína AM) e B (homodímero de etídio). As concentrações utilizadas das nanoformulações foram de 2,5% (v/v), 5,0% (v/v) e 10,0% (v/v) em solução. Após incubação com os reagentes foi realizada análise em citômetro de fluxo.

Ainda, as células foram avaliadas através do kit APO-DIRECT® (Invitrogen), é um método de coloração para rotular quebras de DNA e DNA celular total para detectar células apoptóticas por citometria de fluxo. Isso ocorre marcando as extremidades 3'-hidroxila com nucleotídeos trifosfato de fluoresceína-desoxiuridina diretamente conjugados (FITC-dUTP). As concentrações utilizadas das nanoformulações foram ampliadas, para verificar possível efeitos tóxicos ao DNA numa faixa maior de concentração, de 1,03% (v/v), 2,06% (v/v), 4,12% (v/v), 8,25% (v/v), 16,50 % (v/v) e 33,00% (v/v).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais resultados da caracterização físico-química estão apresentados na Tabela 1, este conjunto de resultados corrobora a qualidade nanotecnológica das duas formulações desenvolvidas, tanto empregando como polímero o Eudragit S100 (NCt) quanto a poli-ε-caprolactona (LNCt).

A partir dos resultados obtidos com a metodologia do kit *LIVE/DEAD*® todas as nanoformulações testadas (NC, LNC, NCt, LNCt) apresentaram viabilidade celular acima de 90%, tanto no tempo de 24 h (Figura 1A) quanto de 48 h (Figura 1B) de tratamento, independente da dose. Nesses mesmos tempos de exposição observou-se tendência de queda da viabilidade das células quando expostas ao fármaco livre. A partir do tempo testado de 72 horas (Figura 1C) houve queda na viabilidade celular para todas as formulações

testadas, principalmente da formulação NCt, ficando com menos de 60% de viabilidade com o uso de 10,0% de formulação, sendo observado que neste tempo e concentração há dano a membrana plasmática. No entanto, nas análises utilizando o kit APO-DIRECT®, para verificar danos ao material genético, todas as formulações testadas em 24 h (Figura 2A), 48 h (Figura 2B) e 72 h (Figura 2C) apresentaram viabilidade celular superior a 80% independente da concentração, mas apresentando uma tendência de diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração do fármaco livre.

CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos demonstra a potencialidade das nanocápsulas poliméricas, principalmente as nanocápsulas de núcleo lipídico, em atuarem como sistemas carreadores do fármaco anticoccidiano toltrazuril. Os resultados indicam que este sistema nanoestruturado é promissor para continuidade dos demais experimentos *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

1. BRANDÃO, H. M. et. al. Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. Rev. CFMV, v. 53, p. 61-67, 2011.
2. FATOBA, A. J.; ADELEKE, M. A. Diagnosis and control of chicken coccidiosis: a recent update. Journal of Parasitic Diseases, [s.l.], v. 42, n. 4, p.483-493, 29 out. 2018.
3. FESSI, H. et. al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. International Journal of Pharmaceutics, v. 55, p.1-4, 1989.
4. JABIR, N. R. et al. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. International Journal of Nanomedicine, [s.l.], p.4391-4408, ago. 2012.

Tabela 1. Características físico-química das nanocápsulas poliméricas contendo toltrazuril (n=3).

	pH	Diâmetro médio (nm)	Potencial zeta	Teor (%)	Eficiência de encapsulação (%)
LNCt	5,1±0,2	191±6	-7,72±0,40	100,26±1,14	93,25
NCt	4,1±0,4	166±4	-11,53±0,50	98,87±2,12	92,68

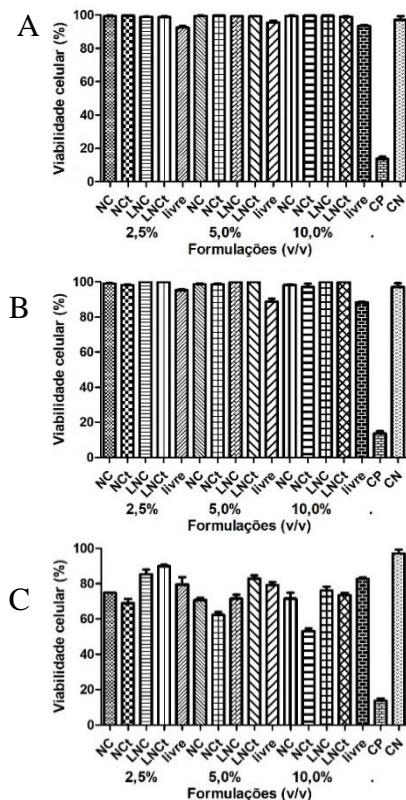


Figura 1. Viabilidade celular de fibroblastos aviários em 24 h, 48 h e 72 h através do % de células viáveis para as diferentes concentrações das formulações testadas (utilizando o kit LIVE/DEAD®). NC: nanocápsula polimérica de Eudragit® S100; NCt: nanocápsula polimérica de Eudragit® S100 contendo toltrazuril; LNC: nanocápsulas de núcleo lipídico de poli (ε-caprolactona); LNCt: nanocápsulas de núcleo lipídico de poli (ε-caprolactona) contendo toltrazuril; livre: solução toltrazuril.

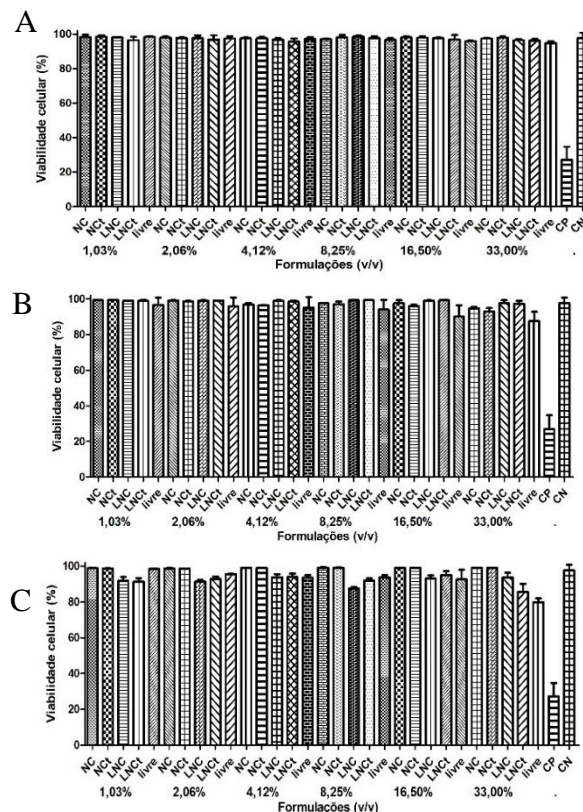


Figura 2: Viabilidade celular de fibroblastos aviários em no tempo de 24 h, 48 h e 72 h através do % de células viáveis para as diferentes concentrações das formulações testadas (utilizando o kit APO-DIRECT®). NC: nanocápsula polimérica de Eudragit® S100; NCt: nanocápsula polimérica de Eudragit® S100 contendo toltrazuril; LNC: nanocápsulas de núcleo lipídico de poli (ε-caprolactona); LNCt: nanocápsulas de núcleo lipídico de poli (ε-caprolactona) contendo toltrazuril; livre: solução toltrazuril.