



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

Ciências Ambientais

DIEGO FARIA COLA

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS COMO SISTEMAS CARREADORES PARA
IVERMECTINA E METOPRENO VISANDO APLICAÇÕES EM VETERINÁRIA**

Sorocaba
2016

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

ciências
ambientais



unesp
Sorocaba

DIEGO FARIA COLA

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS COMO SISTEMAS CARREADORES PARA
IVERMECTINA E METOPRENO VISANDO APLICAÇÕES EM VETERINÁRIA**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Sorocaba

2016

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba

Cola, Diego Faria.

Nanopartículas lipídicas como sistemas carreadores para ivermectina e metopreno visando aplicações em veterinária / Diego Faria Cola, 2016.

85 f.: il.

Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Ciência e Tecnologia (Câmpus de Sorocaba), 2016.

1. Nanotecnologia. 2. Nanopartículas. 3. Ivermectina. 4. Biodisponibilidade. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Ciência e Tecnologia (Câmpus de Sorocaba). II. Título.

Aos meus pais, Luiz Antonio e Ivete,
pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas.

À minha namorada, Priscila,
pelo apoio incondicional e constante incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma vez ter me dado luz, força e serenidade para continuar mais uma etapa da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto, pela confiança, paciência, incentivo, amizade e excelente orientação.

Aos meus pais pelo amor e dedicação e por me proporcionarem todas as condições em minhas buscas por meus objetivos pessoais e profissionais.

Aos meus irmãos pelo companheirismos, pelos muitos interesses compartilhados e pelos bons momentos vividos.

À minha família pelo apoio e estímulo na busca do sucesso.

À minha namorada pelo incentivo, apoio e compreensão pelos momentos de ausência.

Aos meus companheiros(as) de laboratório pela convivência e pela troca de conhecimentos e informações no dia a dia.

Aos amigos de pós-graduação em Ciências Ambientais pelo respeito e amizade. Meus sinceros desejos de sucesso e realização a cada um de vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e a Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) pela oportunidade e estrutura oferecidas para o desenvolvimento de meu trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio através da bolsa de mestrado concedida para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

*“Demore o tempo que for para decidir o que você quer da vida,
e depois que decidir não recue ante nenhum pretexto,
porque o mundo tentará te dissuadir.”*

Friedrich Nietzsche

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Nanotecnologia.....	16
1.1.1 Nanotecnologia aplicada à veterinária.....	17
1.2 Compostos ativos utilizados no controle de endo e ectoparasitas.....	22
1.2.1 Ivermectina.....	22
1.2.2 Metopreno.....	23
1.3. Carreadores lipídicos.....	24
1.3.1 Nanopartículas lipídicas sólidas.....	25
1.3.2 Carreadores lipídicos nanoestruturados.....	26
1.3.3 Matéria-prima utilizada no preparo de NLS e CLN.....	27
1.3.3.1 Tripalmitato de glicerol.....	28
1.3.3.2 Ácido Oléico.....	28
1.3.3.3 Poli (Álcool Vinílico).....	29
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Gerais.....	30
2.2 Específicos.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Materiais.....	31
3.2 Preparo de Nanopartículas Lipídicas Sólidas e Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.....	31
3.3 Metodologia analítica de quantificação dos ativos por CLAE.....	32
3.4 Medidas de caracterização e estabilidade das formulações.....	33
3.4.1 Diâmetro médio e Polidispersão.....	33
3.4.1.1 Medida de distribuição de tamanho de partículas por espectroscopia de correlação de fótons.	33
3.4.2 Potencial Zeta.	33
3.4.3 pH e quantificação de Ácidos Graxos Livres.	33

3.4.4 Rastreamento de nanopartículas.....	34
3.4.5 Eficiência de encapsulação dos ativos nas formulações.....	34
3.4.6 Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	35
3.5 Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	35
3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	36
3.7 Ensaio de cito e genotoxicidade.....	36
3.7.1 Citotoxicidade - Teste de redução do tetrazolium MTT (Método colorimétrico).....	36
3.7.2 – Genotoxicidade.....	37
3.8. Teste de Permeação em membranas modelos.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Medidas de caracterização e estabilidade das formulações.....	38
4.1.1 Quantificação dos ativos por CLAE.....	38
4.1.2 Diâmetro médio e polidispersão.....	40
4.1.3 Rastreamento de nanopartículas.....	45
4.1.4 Potencial Zeta.....	48
4.1.5 pH e Quantificação de Ácidos Graxos Livres.....	50
4.1.6 Caracterização de possíveis interações entre fármacos e os sistemas carreadores por Infravermelho.....	52
4.1.7 Eficiência de encapsulação.....	56
4.1.8 Ensaio de liberação dos ativos.....	57
4.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	60
4.3 Ensaios de cito e genotoxicidade.....	63
4.3.1 Ensaio de citotoxicidade – Teste de redução do tetrazolium MTT (método colorimétrico).....	63
4.3.2 Ensaio de genotoxicidade <i>Allium cepa</i>	66
4.4. Teste de Permeação em membranas modelos.....	67
5 CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da Ivermectina.	22
Figura 2 – Estrutura química do Metopreno.	23
Figura 3 – Estrutura química do lipídio Tripalmitina. Em destaque encontra-se representado o grupamento glicerol ao qual encontram-se ligados os ácidos graxos saturados.	28
Figura 4 – Estrutura química do ácido oleico.	29
Figura 5 – Representação esquemática da estrutura monomérica do álcool polivinílico. O índice n representa o número de unidades monoméricas que forma o polímero, podendo variar de acordo com o tamanho da cadeia polimérica.....	29
Figura 6 – Curva padrão da Ivermectina base para quantificação do ativo por CLAE obtido sob as condições cromatográficas: coluna C18 fase reversa, fase móvel constituída por acetronitrila/água/metanol, volume de injeção de 100 µL, leitura em triplicata.	39
Figura 7 – Curva padrão da Metopreno base para quantificação do ativo por CLAE obtido sob as condições cromatográficas: coluna C18 fase reversa, fase móvel constituída por acetronitrila/água, volume de injeção de 20 µL, leitura em triplicata.....	39
Figura 8 – Distribuição de tamanho de NLS para os tempos 0, 60 e 120 dias na ausência de fármacos (a), contendo IVM (b) e contendo MTP (c).....	41
Figura 9 – Tamanho médio das NLS com e sem IVM e MTP em função do tempo. As medidas foram realizadas em triplicada (n=3). Utilizou-se o teste ANOVA para verificação de alterações significativas, sendo considerada uma significância de $p < 0,05$ para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos, onde a* representa variações não significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero; b* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero.....	41
Figura 10 – Tamanho médio dos CLN com e sem IVM e MTP em função do tempo. As medidas foram realizadas em triplicada (n=3). Utilizou-se o teste ANOVA para verificação de alterações significativas, sendo considerada uma significância de	

p<0,05 para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos, onde a* representa variações não significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero; b* representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero.....	42
Figura 11 – Polidispersão média de NLS com e sem IVM e MTP em função do tempo.	44
Figura 12 – Polidispersão média de CLN com e sem IVM e MTP em função do tempo.....	44
Figura 13 – Distribuição de tamanho das partículas em função da concentração no tempo de 0 dias. A) NLS; B) NLS contendo IVM; C) NLS contendo MTP; D) CLN; E) CLN contendo IVM e CLN contendo MTP. As análises foram realizadas a 25°C. A linha vermelha é correspondente ao desvio padrão das análises.	46
Figura 14 – Distribuição de tamanho das partículas em função da concentração no tempo de 120 dias. A) NLS; B) NLS contendo IVM; C) NLS contendo MTP; D) CLN; E) CLN contendo IVM e CLN contendo MTP. As análises foram realizadas a 25°C. A linha vermelha é correspondente ao desvio padrão das análises.	47
Figura 15 – Potencial zeta de NLS com e sem IVM e MTP em função do tempo de 120 dias.	49
Figura 16 – Potencial zeta de CLN com e sem IVM e MTP em função do tempo de 120 dias.	49
Figura 17 – pH das NLS com e sem IVM e MTP em função do tempo de 120 dias.	51
Figura 18 – pH das CLN com e sem IVM e MTP em função do tempo de 120 dias.....	51
Figura 19 – Espectros de infravermelho para tripalmitina, ácido oleico e mistura física entre tripalmitina e ácido oleico. As setas indicam em cada espectro as principais bandas de absorção características.....	53
Figura 20 – Espectros de infravermelho para NLS com os ativos IVM (a) e MTP (b). As setas indicam em cada espectro as principais bandas de absorção características.....	54

Figura 21 – Espectros de infravermelho para CLN com os ativos IVM (a) e MTP (b). As setas indicam em cada espectro as principais bandas de absorção características.....	55
Figura 22 – Ensaio de liberação <i>in vitro</i> dos ativos IVM e MTP das partículas de NLS em função do tempo de 180 minutos.	57
Figura 23 – Ensaio de liberação <i>in vitro</i> dos ativos IVM e MTP das partículas de CLN em função do tempo de 180 minutos.	58
Figura 24 – Resultados obtidos com o modelo Korsmeyer-Peppas: A) NLS com IVM, B) NLS com MTP, C) CLN com IVM e D) CLN com MTP.....	59
Figura 25 – Micrografias de NLS no tempo de 0 dias contendo IVM (a) e MTP (b), e CLN contendo os ativos IVM (c) e MTP (d).	61
Figura 26 – Micrografias de NLS no tempo de 0 dias contendo IVM (a) e MTP (b), e CLN no tempo de 0 dias contendo os ativos IVM (c) e MTP (d) com aumento de 27800 vezes	62
Figura 27 – Avaliação da citotoxicidade de células 3T3 para IVM, NLS e NLS com IVM (a); IVM, CLN e CLN com Ivm (b); MTP, NLS e NLS com MTP (c); e MTP, CLN e CLN com MTP (d).....	63
Figura 28 – Avaliação da citotoxicidade de células V79 para IVM, NLS e NLS com IVM (a); IVM, CLN e CLN com Ivm (b); MTP, NLS e NLS com MTP (c); e MTP, CLN e CLN com MTP (d).	64
Figura 29 – Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de células de <i>Allium cepa</i> para os fármacos IVM e MTP, carreadores NLS e CLN, e formulações de NLS com IVM; CLN com IVM, NLS com MTP e CLN com MTP. Utilizou-se o teste ANOVA para verificação de alterações significativas, sendo considerada uma significância de $p < 0,05$ para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos, onde a representa variações não significativas entre as formulações em relação ao controle; b representa variações significativas formulações em relação ao controle.....	66
Figura 30 – Sistema Microette Plus Hanson: (a) Visão geral do sistema; (b) A célula de Franz; (c) Detalhes da célula de difusão vertical de Franz.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistemas de nanocarreadores utilizadas para a entrega de drogas e vacinas para uso veterinário por espécie, tipo de carreador, doenças e via de administração..	18
Tabela 2 – Comparação entre os valores obtidos para a distribuição de tamanho obtidos a partir das técnicas de DLS e NTA para NLS e CLN sem e contendo IVM e MTP, nos tempos de 0 e 120 dias.....	48
Tabela 3 – Quantificação de ácidos graxos livres (ácido palmítico) no tempo de 30 dias de armazenamento.....	52
Tabela 4 – Porcentagem de encapsulação dos ativos IVM e MTP.	57
Tabela 5 – Valores de constantes de liberação (k), expoente de liberação (n) e coeficiente de correlação (r) obtidos das curvas das cinéticas de liberação dos fármacos associados às nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados.....	60
Tabela 6 – Valores de IC_{50} para as formulações de NLS e CLN na ausência e contendo IVM e MTP, e de IVM e MTP para células 3T3 e V79.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CLN – Carreadores Lipídicos Nanoestruturados
ECF – Espectroscopia de correlação de fótons
EPA – Agência de Proteção Ambiental
FTIR – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GH – Grau de hidrólise
HP – Homogeneização à Alta Pressão
IC₅₀ – Índice de citotoxicidade para 50% da população em estudo
IVM – Ivermectina
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
MTP – Metopreno
MTT – 3(4-5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio
NLS – Nanopartículas Lipídicas Sólidas
NTA – Nanoparticle tracking analysis
PVA – Poli (Álcool Vinílico)

Cola, D.F. Nanopartículas lipídicas como sistemas carreadores para ivermectina e metopreno visando aplicações em veterinária [dissertação]. Sorocaba (SP): Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

O estudo de características e aplicações de estruturas em escala nanométrica passou a ter um grande interesse de pesquisadores das áreas médicas (humana e animal), ambiental e agrícola. Entre essas estruturas, destacam-se os nanocarreadores, que permitiram a melhoria da biodisponibilidade de muitos compostos bioativos e a diminuição de possíveis efeitos toxicológicos. Além disso, evitar a ocorrência de altos prejuízos na agropecuária com o desenvolvimento de novos nanocarreadores voltados ao combate de endo e ectoparasitas causadores de grandes prejuízos aos pecuaristas. Fármacos como a Ivermectina e o Metopreno são utilizados no combate de ectoparasitas, no entanto, estes compostos possuem problemas relacionados à biodisponibilidade. Este trabalho teve como objetivo preparar e caracterizar sistemas carreadores lipídicos, como as Nanopartículas Lipídicas Sólidas e os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados a fim de melhorar e produzir alternativas para o uso destes compostos visando aplicações em veterinária. Na primeira etapa do trabalho foram preparadas e caracterizadas as nanopartículas lipídicas sólidas e os carreadores lipídicos nanoestruturados contendo os fármacos ivermectina e metopreno. As propriedades físico-químicas das suspensões coloidais, como, diâmetro, polidispersão, potencial zeta, pH e eficiência de encapsulação foram avaliadas em função do tempo. A eficiência de encapsulação alcançada foi acima de 99% para ambos os fármacos, sendo que as suspensões coloidais apresentaram estabilidade durante o período investigado. Os resultados do ensaio de citotoxicidade e genotoxicidade demonstram que as nanopartículas testadas para a encapsulação possibilitaram um aumento na viabilidade celular das células testadas, onde as nanopartículas lipídicas sólidas apresentaram menor toxicidade do que os carreadores lipídicos nanoestruturados. As nanopartículas lipídicas sólidas apresentaram tamanho médio de $285,6 \pm 15,8$ nm e os carreadores lipídicos nanoestruturados de $257,5 \pm 7,4$ nm. Todas os carreadores apresentaram morfologia esférica, sem formação de agregados e sem alterações morfológicas após a encapsulação. Portanto, os resultados deste trabalho demonstraram que as nanopartículas apresentaram boas características coloidais e a presença ou ausência de drogas não provocam alterações nas características das nanopartículas, possibilitando o desenvolvimento de sistemas carreadores para estas drogas visando aplicações veterinárias.

Palavras-chave: Nanocarreadores. Ivermectina. Metopreno. Nanopartículas. Ectoparasitas.

ABSTRACT

The study characteristics and structures of applications in nanoscale have a great interest of researchers in medical areas (human and animal), environment and agriculture. Among these, the nanocarriers stand out, that allowed improve the bioavailability of many bioactive compounds and the reduction of potential toxicological effects, and prevent the occurrence of high losses in agriculture with the development of new nanocarriers aimed at fighting and endo ectoparasites causing great harm to farmers. Drugs such as Ivermectin and Methoprene are used to combat ectoparasites, however, these compounds possess bioavailability problems related. This study aimed to prepare and characterize lipid carrier systems, such as Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid carriers to improve and produce alternatives to the use of these compounds targeting applications in veterinary. In the first stage of the work we have been prepared and characterized the solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers containing the drug ivermectin or methoprene. The physico-chemical properties of colloidal suspensions such as, diameter, polydispersity, Zeta potential, pH and encapsulation efficiency were measured as a function of time. The encapsulation efficiency was achieved above 99% for both drugs, and colloidal suspensions were stable during the period investigated. The results of the cytotoxicity and genotoxicity test demonstrate that the tested nanoparticles for encapsulating allowed an increase in cell viability of test cells, where the solid lipid nanoparticles had lower toxicity than the nanostructured lipid carriers. The solid lipid nanoparticles have an average size of $285,6 \pm 15,8$ nm and nanostructured lipid carriers $257,5 \pm 7,4$ nm. All the carriers had spherical morphology without forming aggregates and without morphological changes after encapsulation. Therefore, the results of this study demonstrated that the colloidal nanoparticles showed good characteristics and the presence or absence of drug do not cause changes in the characteristics of the nanoparticles, allowing the development of carrier systems for drug targeting these veterinary applications.

Keywords: Nanocarriers. Ivermectin. Methoprene. Nanoparticles. Ectoparasites.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia

O estudo de características e aplicações de estruturas em escala nanométrica tem apresentado um grande interesse a pesquisadores das áreas médica (humana e animal), ambiental e agrícola. Estas estruturas nanométricas, preparadas de diferentes formas, permitiram o avanço da nanotecnologia. Dentre essas estruturas, destacam-se os nanocarreadores, que permitiram melhorar a biodisponibilidade de muitos compostos bioativos, como por exemplo, o aumento da solubilidade aquosa melhorando assim processos de absorção e distribuição tecidual (farmacocinética) e também pela diminuição de possíveis efeitos tóxicos (redução da toxicidade local e sistêmica) (FRICKER *et al.*, 2010).

Recentemente, a nanotecnologia tem promovido um grande impulso à inovação e evolução do conhecimento, permeando as principais áreas de Física, Biologia e Química, permitindo a convergência de novas tecnologias para outras áreas específicas, como a das ciências agrárias envolvendo a biotecnologia, a informática de campo, a neurociência, a ciência genômica, entre outras (EGUCHI; CECATO; SILVA, 2013). O desenvolvimento da nanotecnologia permitirá seu uso na produção animal em forma de monitoramento ou mesmo de aplicação direta de produtos nanotecnológicos na saúde, na alimentação, controle de parasitas, conforto térmico e ambiental desses animais (MELA; MENDO, 2010).

A nanotecnologia apresenta grande potencial para revolucionar as pesquisas, possibilitando o desenvolvimento de novos produtos destinados à melhoria da sanidade e saúde animal, o que propicia produtos derivados de animais com maior qualidade e segurança, além de possibilitar potenciais aplicações na área da medicina veterinária, que incluem sistemas de diagnóstico e tratamento de doenças, novas ferramentas para o melhoramento molecular e celular, modificação de resíduos animais, detecção de patógenos, isolamento de toxinas, vetores para o transporte de fármacos (GAO; GU; XU, 2009), entre outros. Os avanços da nanotecnologia trazem possíveis consequências econômicas, sociais, ambientais e políticas.

1.1.1 Nanotecnologia aplicada à veterinária

Nas ciências veterinárias, os processos fundamentais relacionados à vida são explorados através de pesquisas em biologia celular e molecular. Novas ferramentas necessárias para a biologia celular e molecular são projetadas especificamente para a separação, identificação e quantificação de moléculas individuais. Este desenvolvimento ocorre com o auxílio da nanociência, o que permite grandes avanços nas ciências veterinárias, como a ciência reprodutiva e tecnológica através de nanobioprocessamento enzimático, prevenção e tratamento de doenças em animais (SCOTT, 2007).

A aplicação de nanotecnologia na área veterinária pode auxiliar no desenvolvimento de uma nova geração de produtos, como vacinas de uso animal, e de métodos de aplicação de produtos veterinários de forma a aumentar a eficácia destes, reduzir possíveis efeitos tóxicos nos animais, bem como, reduzir possível contaminação ambiental que o uso continuado destes produtos possam causar. No Brasil, muitas iniciativas têm sido realizadas objetivando favorecer o desenvolvimento de produtos utilizando-se a nanotecnologia para aplicações em agricultura e pecuária, com destaque para o investimento governamental em pesquisas e a criação de redes de colaboração, a exemplo a Rede Agronano (EMBRAPA, 2013).

A nanotecnologia permite o desenvolvimento de novos produtos veterinários além da possibilidade de aumentar a biodisponibilidade de compostos bioativos para a obtenção de melhores resultados (MADUREIRA, 2011). Segundo BRANDÃO *et al.* (2011), podem ser destacadas como consequências práticas da associação de um composto bioativo à sistemas nanoestruturados: o uso racional destes compostos, uma vez que tanto o número de doses quanto a concentração podem ser reduzidos durante o tratamento; a possibilidade de aplicação em novas vias de administração; a diminuição na geração de resíduos em produtos de origem animal; diminuição do estresse causado pela aplicação medicamentosa; a redução de toxicidade e efeitos adversos, bem como o uso de novas moléculas na terapêutica animal; dentre outras perspectivas.

Algumas nanoformulações têm sido empregadas de forma bem sucedida para a entrega de fármacos no combate de fungos, protozoários e doenças bacterianas como a candidíase, leishmaniose, salmonelose, brucelose e tuberculose em testes

com animais (MANUJA; KUMAR; SINGH, 2012). Na tabela 1 são apresentadas algumas das tecnologias de nanocarreadores estudadas até o presente momento. Nelas estão destacadas algumas das tecnologias que têm, tiveram ou terão um impacto significativo na área de pesquisas veterinárias através da encapsulação de fármacos ou vacinas por nanocarreadores.

Tabela 1: Sistemas de nanocarreadores utilizadas para a entrega de drogas e vacinas para uso veterinário por espécie, tipo de carreador, doenças e via de administração. (Adaptada de UNDERWOOD e van EPS, 2012).

Espécie	Nanocarreador	Aplicações	Via de Administração
Gato	Emulsão	Anestesia	Intravenosa
	Lipossoma	Adenocarcinoma mamário; Carcinoma das células escamosas;	Intravenosa
		Peritonite infecciosa felina;	Intravenosas, intramuscular, Oral
	Nanopartícula Magnética	Rinite crônica	Intraperitoneal
		Fibrosarcoma	Intratumoral
Cachorro	Emulsão	Imunossupressores para evitar a rejeição de transplantes	Oral
	Lipossoma	Analgesia	Subcutâneo
		Histiocitose maligna	Intravenosa
		Leishmaniose	Intravenosa

		Metástases pulmonares osteosarcoma	Intravenosa
		Tumores caninos;	Intravenosa
		Sarcoma de tecido mole	Intravenosa
		Blastomicose	Intravenosa
		Hemangiosarcoma	Intraperitoneal
		Dermatite atópica	Intradérmica
		Neoplasia pulmonar	Inalação
		Melanoma oral	Intravenosa
Porco	Dendrímeros	Febre aftosa	Intramuscular
	Lipossoma	Suplementação de vitamina E	Oral
	Nanocompósito de cromo	Suplementação de cromo	Oral
	Nanopartícula Polimérica	<i>E. coli</i>	Oral
Gado	Lipossoma	Brucelose	Intramamária
		Mastite causada por <i>S. aureus</i>	Intramamária
		Leucemia	Intravenosa
	Niossoma	Analgésico	Transdérmica
	Nanopartícula	Vírus Sincicial	
Cavalo	Lipossoma	Anti-inflamatório, Analgésico	Transdérmica
		Transfecção de	---

		espermatozoides	Intramuscular
		Tratamento da babesiose	
	Microemulsão	Vacina contra <i>T. gondii</i>	Intramuscular
	Micelas	Anestesia	Intravenosa
			Intramuscular
	Nanoesferas de polímero	Parasitose por <i>Strongylus vulgaris</i>	
		Vacina contra garrotilho	Intranasal
	Nanopartícula adjuvante à base de água		Transdérmica
		Vacina contra pneumonia causada por <i>R. equi</i>	
Ovelha	Lipossoma	Vacina contra vírus de leucemia bovina	Intramuscular
		Vacina contra mastite estafilocócica	Intramuscular
	Nanoesferas de poliestireno	Avaliação de nanoesferas como adjuvantes	Subcutâneo, Intramuscular, Intradérmica
			Intradérmica
	Micelas	Vacina contra febre aftosa	
		<i>Fasciola hepatica</i>	Subcutâneo
Pássaros	Lipossoma	Artrite em papagaios e canários	Subcutâneo
		Vacina contra colibacilose aviária	Intraocular
		Vacina contra <i>Salmonella enteritidis</i>	Intraocular/ Nebulização

	Vírus da doença de Newcastle e da vacina contra o vírus da doença de Gumboro	Transdérmica
	Vacina contra <i>M. gallisepticum</i>	Subcutâneo
		Oral
Micelas	Vacina contra doença de Newcastle	Nebulização
Nanopartícula polimérica	Vacina contra <i>C. psittaci</i>	Oral
		Intramuscular
Nanopartículas de quitosana	Suplementação de cobre	
Nanoesferas de quitosana	Vacina contra doença de Newcastle	

Como se observa na tabela 1 há grande potencial para uso de nanocarreadores para uso de entrega de fármacos e vacinas para o combate de doenças em animais.

Atualmente há no mercado alguns produtos veterinários desenvolvidos através do uso da nanotecnologia, dos quais podemos citar: Nano-E[®], uma nanodispersão e lipossomas encapsulados para suplementação natural de vitamina E para cavalos (KERRX, 2015); Equilis[®]Prequenza, uma vacina contra a gripe equina que utiliza tecnologia de nanopartículas (BIOSPACE, 2012); Montanide[®], um adjuvante criado para melhorar a eficácia, segurança e estabilidade da vacina a partir do uso de emulsão, nanoemulsão ou tecnologia de polímeros (SEPPIC, 2015); Collargolina[®], um produto a base de prata coloidal que possui ação bacteriostática, que aumenta a resistência orgânica do animal contra os processos infecciosos, além de exercer ação oxidativa sobre as toxinas bacterianas reduzindo-as a substâncias inócuas ao organismo animal (UCB VET, 2015); e uma nanovacina veterinária da Bionanoplus, destinada à prevenção de infecções em peixes, que utiliza

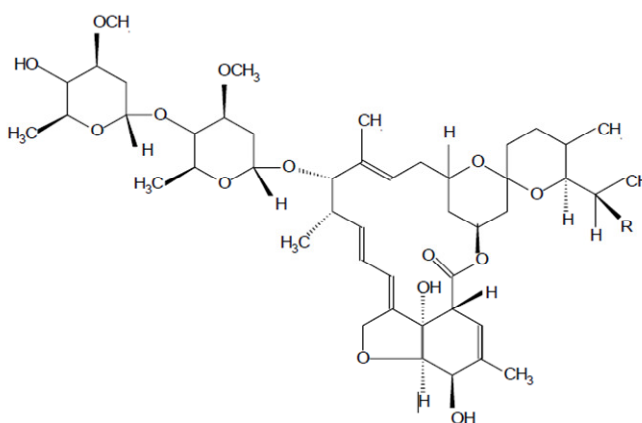
nanoadjuvantes poliméricos com base em extratos de subunidades bacterianas (BIONANOPLUS, 2015).

1.2 Compostos ativos utilizados no controle de endo e ectoparasitas

1.2.1 Ivermectina

A Ivermectina (IVM) (Figura 1) é um composto pertencente ao grupo das lactonas macrocíclicas que foi sintetizada pela primeira vez na década de 1970, no Japão, a partir de fungos *Streptomyces avermitilis*, sendo assim descoberta uma nova classe, as avermectinas (BOOTH; McDONALD, 1992). Seu mecanismo de ação contra os parasitas ocorre por meio da estimulação da liberação do neurotransmissor inibidor GABA (ácido gama-aminobutírico) na fenda sináptica entre interneurônios do cordão central e neurônios motores (BILL, 1993; McCALL; LINDEMANN; PORTER, 1996). A Ivermectina é constituída por uma mistura racêmica dos isômeros 22,23-di-hidroavermectina B1a e 22,23-di-hidroavermectina B1b.

Figura 1 – Estrutura química da Ivermectina.



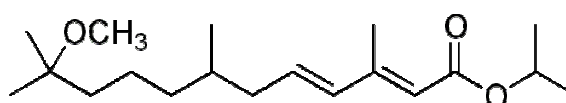
Desta forma, quanto maior a liberação de GABA, maior será a hiperpolarização do potencial de repouso normal das células pós-sinápticas, tornando difícil a neurotransmissão dos estímulos para os músculos periféricos (PIMPÃO *et al.*, 2005). Portanto, sob a influência de uma pequena quantidade das avermectinas, os parasitas ficam paralisados, sendo posteriormente expelidos pelo organismo (BOOTH; McDONALD, 1992).

A Ivermectina vem sendo amplamente utilizado em animais de grande porte, como bovinos, eqüinos, ovinos, caprinos e camelídeos, como tratamento e controle das parasitoses causadas por nematódeos gastrointestinais e pulmonares, sendo utilizada para tratamento das infestações por sarnas sarcóptica, octodécica e demodécica (BOOTH; McDONALD, 1992; ANDRADE; RODRIGUES, 2002). As possíveis reações adversas provocadas pela administração da Ivermectina são conhecidas e documentadas na literatura médico-veterinária. Estas reações, quando o fármaco for administrado por via oral, podem ser observadas em 24 horas, ocasionando em: perda do controle motor causando incapacidade de manter postura, membros cruzados e ataxia; letargia; fraqueza; perda de reflexos visuais; depressão respiratória; bradicardia; midríase; tremores; hipersalivação; coma e eventualmente a morte (MELO; MARQUES; VIANA, 1995). A Ivermectina apresenta solubilidade em água de 4 µg/mL e faixa de temperatura de ebulição entre 155 a 157 °C.

1.2.2 Metopreno

O Metopreno (MTP) (isopropil (2E, 4E)-11-metoxi-3,7,11-trimetil-2,4-dodecadienoate), Figura 2, foi o primeiro regulador de crescimento de insetos para o controle de larvas de mosquitos aprovado em 1970 pela Agência de Proteção Ambiental (EPA, EUA), depois de muitos anos de estudos onde se observou que o metopreno apresenta baixa toxicidade para os vertebrados (ZOECON CORPORATION, 1974). O Metopreno possui a capacidade de combater uma variedade de espécies de insetos, incluindo Diptera, Lepidoptera, Siphonaptera e Coleoptera, o que possibilita ao metopreno uma grande capacidade de controlar uma variedade de pragas (DAGLISH; HOLLOWAY; NAYAK, 2013).

Figura 2 – Estrutura química do metopreno.



Reguladores de crescimento de insetos provocam a perturbação nos processos enzimáticos regulados por hormônios que são relativamente específicos para a fisiologia dos insetos (RETNAKARAN; GRANETT; ENNIS, 1985; DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998). O Metopreno é um dos reguladores de crescimento de insetos mais utilizados e bem-sucedidos existentes, exercendo a sua toxicidade para atingir insetos, agindo como um agonista do hormônio juvenil (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998), impedindo o surgimento de descendentes sem matar os insetos adultos (AMOS; WILLIAM, 1977).

O Metopreno possui solubilidade em água de 1,4 µg/mL, apresentando uma rápida degradação na água e em presença de luz, limitando assim em alguns casos o seu uso. Porém, não provoca bioacumulação em peixes e não persiste no ambiente, sofrendo rápida degradação e metabolismo de plantas, animais, micro-organismos aquáticos e de solo (HENRICK, 2007).

As verminoses são responsáveis por um prejuízo de US\$ 6,34 bilhões, seguido do berne que responde por US\$ 4 bilhões em perdas. Já a mosca-dos-chifres e dos estábulos, juntas, representam um impacto de mais de US\$ 3 bilhões por ano. A bicheira, outro problema que afeta o produtor, atinge a casa de US\$ 83,5 milhões em prejuízos. Por último, mas não menos importante, o carrapato-do-boi acarreta US\$ 3,957 bilhões por ano de danos para a produção de leite e de corte (EMBRAPA, 2013).

Devido às características dos dois ativos, o desenvolvimento de produtos e processos mais eficientes destinados ao combate e controle dos efeitos de endo e ectoparasitas em veterinária tem se mostrado necessário. Neste contexto, a nanotecnologia tem um grande potencial para auxiliar no desenvolvimento de soluções para redução de prejuízos econômicos para a pecuária, bem como para a minimização de possíveis impactos ambientais destes produtos no ambiente.

Como possibilidades para aumento da eficácia e estabilidade de fármacos como ivermectina e metopreno, destacam-se os sistemas carreadores lipídicos.

1.3. Carreadores Lipídicos

Na literatura há descrito diversos métodos de preparo de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN), podendo destacar como principais métodos: homegeneização de alta pressão a quente e a

frio, microemulsão, emulsificação/evaporação do solvente, nanoprecipitação, emulsificação-difusão do solvente e coacervação. Para realizar a encapsulação de princípios ativos, deve-se atentar ao método escolhido, pois a opção pelo método mais apropriado deriva das propriedades do ativo, como a estabilidade em temperaturas elevadas, volatilidade e principalmente a solubilidade (SOUTO *et al.*, 2011; MULLER; MADER; GOHLA, 2000).

1.3.1 Nanopartículas Lipídicas Sólidas

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas constituídos por lipídeos sólidos sob temperatura ambiente e corporal (MULLER; MADER; GOHLA, 2000). As NLS foram desenvolvidas como uma alternativa aos sistemas carreadores poliméricos, combinando as vantagens das nanopartículas poliméricas, emulsões e lipossomas, porém evitando algumas desvantagens, como as relacionadas à estabilidade e a possíveis processos de escalonamento (FRICKER *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2008; KRISTL *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2007; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; MÜLLER *et al.*, 2008; RADOMSKA-SOUKHAREV, 2007; WESTESEN; BUNJES, 1995; ZHANG *et al.*, 2006), além de apresentarem menor custo de produção.

As NLS apresentam tamanho entre 50 e 1000 nm, são formadas por lipídios e estabilizadas por tensoativos (MEHNERT; MADER, 2001; MULLER; MADER; GOHLA, 2000). As NLS possuem grande estabilidade em meio biológico por apresentarem núcleo rígido e sólido, envolto por uma camada de fosfolipídios. As NLS podem ser utilizadas para encapsular compostos lipofílicos, sendo de 10 a 100 vezes menos tóxicas que as partículas poliméricas.

O termo nanopartícula lipídica sólida (NLS) foi criado na década de 1990 quando ocorreu o desenvolvimento das primeiras patentes por GASCO (1993) e por MÜLLER e LUCKS (1996), que utilizaram um método de produção de NLS por homogeneização à alta pressão (HP).

As NLS possuem grande importância por apresentarem como vantagens uma boa estabilidade física, química e biológica, excelente tolerabilidade, boa biodegradação, alta disponibilidade, possibilita a liberação sustentada por possuir uma matriz sólida, permite a prevenção da degradação química ou oxidativa do

composto encapsulado, além da possibilidade da metabolização de sua matriz lipídica por diversos organismos (MULLER; MADER; GOHLA, 2000; MANDAWGADE *et al.*, 2008; JOSHI e MÜLLER, 2009; SOUTO *et al.*, 2011). Essa matriz é composta por lipídeos sólidos em temperatura ambiente e corporal, tensoativo(s) e água. Estes lipídeos podem incluir triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e ceras; todas as classes de tensoativos (iônico ou não-iônico com diferentes massas moleculares) podem ser utilizadas para estabilizar a dispersão lipídica e a sua escolha depende da via de administração (MEHNERT; MÄDER, 2001). A preparação empregada pode exigir ou não a utilização de solventes orgânicos e este sistema apresentará uma ampla gama de aplicações, podendo destacar as possíveis aplicações agrícolas (WISSING; KAYSER; MULLER, 2004; MANJUNATH; REDDY; VENKATESWARLU, 2005).

1.3.2 Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram desenvolvidos como uma segunda geração das NLS, com o objetivo de melhorar a eficiência de encapsulação e o tempo de retenção do fármaco durante o período de armazenamento (WISSING; KAYSER; MULLER, 2004). Diferentemente das NLS que são produzidas a partir de lipídios sólidos, os CLN são compostos de uma matriz lipídica sólida encapsulando compartimentos de lipídios líquidos. Uma das vantagens dos CLN em relação às NLS deve-se ao fato de nas CLN o fármaco não é expulso do interior das nanopartículas, como ocorre nas NLS (FANG *et al.*, 2008; TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2007).

Os CLN são considerados a geração mais inteligente de sistemas carreadores lipídicos de fármacos, devido ao fato de possuírem uma natureza lipofílica, sendo bastante utilizados como sistema de carreadores para alguns fármacos que possuem maior solubilidade em lipídios líquidos do que em lipídios sólidos (CHEN *et al.*, 2010; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2004), o que possibilita uma maior eficiência de encapsulamento dos NLS. Desta forma, os CLN apontam uma maior capacidade de encapsulamento e menor grau de expulsão do fármaco no período de armazenamento (TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2007).

O preparo das nanopartículas lipídicas é induzida por critérios que diversificam de acordo com o material lipídico utilizado, tal como a composição, a conduta de cristalização do lípido e a hidrofobicidade que, sensibiliza a configuração, a superfície específica e as características autoemulsionantes dos cristais lipídicos (RAI *et al.*, 2008). Com relação à ação dos lípidos sobre o tamanho das nanopartículas, RAI *et al.*, (2008) expõe que lípidos com ponto de fusão maiores podem proporcionar um acréscimo na configuração das nanopartículas, e os lípidos com cadeias menores de ácidos gordos e com números relevantes de mono e diglicerídeos acarretam em nanopartículas com dimensões menores. Um acréscimo de 5-10 % no volume lipídico geram partículas de maior tamanho e uma distribuição mais ampla do tamanho das partículas, ou seja, um acréscimo no valor do índice de polidispersão (VENUGANTI; PERUMAL, 2009). Este fato pode estar vinculado com o acréscimo da viscosidade do sistema e com uma resultante diminuição da eficácia na etapa de homogeneização que, por sua vez, pode resultar na aglomeração das partículas (GONZALEZ-MIRA, *et al.*, 2011; LIPPACHER; MÜLLER; MÄDER, 2004). Assim, originam-se partículas com maiores tamanho e índice de polidispersão (TIYABOONCHAI; TUNGPRADIT; PLIANBANGCHANG, 2007).

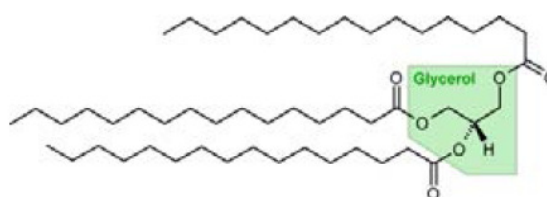
1.3.3 Matéria-prima utilizada no preparo de NLS e CLN

Diversos tipos de lipídios podem ser utilizados para constituir a matriz das nanopartículas, dos quais se incluem os acilgliceróis, ceramidas, ácidos e álcoois graxos, que são fisiologicamente compatíveis e atuam no metabolismo natural dos lipídeos no organismo, sendo que mesmo com concentrações de 5 a 30 % apresentam baixa toxicidade (SEVERINO *et al.*, 2012; SOUTO; MÜLLER, 2005). Entretanto, assim como os lipídios, é necessário também o uso de agentes tensoativos, pois estes reduzem a tensão interfacial e evitam a deposição e aglomeração das nanopartículas difundidas na fase aquosa, sendo que comumente as NLS são formadas por 0.1 a 30% (m/m) de lipídeo sólido e estabilizadas por 0.5 a 5% (m/m) (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009).

1.3.3.1 Tripalmitato de glicerol

O tripalmitato de glicerol (1,2,3-trihexadecanoil-sn-glicerol) (ou tripalmitina), Figura 3, é pertencente à classe dos triacilgliceróis simples, que são fruto do processo de esterificação entre o glicerol e ácidos graxos, sendo essas substâncias hidrofóbicas, ou seja, insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos. Os triacilgliceróis possuem diferentes ácidos graxos em sua estrutura, representando por R, R' e R'', sendo que estes também podem ser iguais, porém dependendo da posição destes ácidos graxos na unidade de glicerol eles recebem nomes diferentes. A tripalmitina é sólida em temperatura ambiente (MORETTO; FETT, 1998; PAQUES; MACEDO, 2006), possui massa molar de 807,32 g/mol, ponto de fusão na faixa entre 44,7 e 67,4 °C.

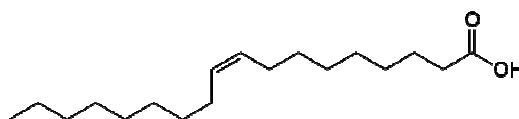
Figura 3 – Estrutura química do lipídio Tripalmitina. Em destaque encontra-se representado o grupamento glicerol ao qual encontram-se ligados os ácidos graxos saturados.



1.3.3.2 Ácido Oleico

O ácido oleico (ácido (9Z)-octadecanóico), Figura 4, é um ácido graxo de cadeia longa que possui dezoito carbonos e uma insaturação cis entre os carbonos 9 e 10; é um líquido viscoso de cor amarelada. O ácido oleico é o principal constituinte de óleos de oliva e canola, sendo obtido a partir da hidrólise de algumas gorduras animais e de óleos vegetais. O ácido oleico é muito utilizado na indústria cosmética como aditivo em base de sabões, sabonetes e cremes devido a capacidade de lubricidade e emoliência. Os óleos vegetais ricos em ácido oleico ou ácido oleico puro possuem propriedades de alta viscosidade, baixa volatilidade e boa lubricidade, além de serem não-tóxicos e biodegradáveis (LATHI; MATTIASSON, 2007; BUNKER; WOOL, 2002). O ácido oleico possui massa molar de 282,47 g/mol.

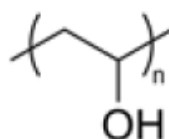
Figura 4 – Estrutura química do ácido oleico.



1.3.3.3 Poli (Álcool Vinílico)

O Poli (álcool vinílico) ou PVA, Figura 5, é um polímero produzido pela polimerização do acetato de vinila seguido de reação de hidrólise do poli (acetato de vinila) em poli (álcool vinílico), sendo que após a reação de hidrólise o copolímero final exibe um percentual de hidroxilas em comparação ao número total de radicais de ácidos acéticos representando o grau de hidrólise (GH) do polímero. O GH é um parâmetro essencial uma vez que o aumento dele resulta na redução da solubilidade em água juntamente com o aumento na adesão em superfícies hidrofílicas e na viscosidade (ARANHA; LUCAS, 2001; COSTA; MANSUR, 2008). O PVA é um dos raros polímeros semicristalinos que é solúvel em água, sendo que possui inúmeras aplicações como: em fibras, adesivos e emulsificantes, como carregador de medicamentos, utilidade na indústria têxtil, possuindo ótima propriedade como protetor de colóides e na aquisição de membranas anfifílicas para imobilização de enzimas e na engenharia de tecidos, principalmente como plastificante (MARTINELLI *et al.*, 2006).

Figura 5 – Representação esquemática da estrutura monomérica do álcool polivinílico. O índice n representa o número de unidades monoméricas que forma o polímero, podendo variar de acordo com o tamanho da cadeia polimérica.



2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Este trabalho teve como principal objetivo preparar e caracterizar sistemas carreadores lipídicos para dois ativos encapsulados separadamente, utilizados em aplicações veterinárias, a Ivermectina e o Metopreno, visando o desenvolvimento de formas alternativas para o uso destes ativos.

2.2 Específicos

Este trabalho apresentou os seguintes objetivos específicos:

- Preparação de nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados para encapsulação de compostos bioativos (ivermectina e metopreno);
- Caracterização das nanopartículas lipídicas contendo fármacos através de medida de eficiência de encapsulação, medidas de tamanho e potencial zeta, espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica de transmissão;
- Avaliação da estabilidade físico-química das formulações em função do tempo;
- Ensaio de citotoxicidade *in vitro* para avaliação das formulações de nanopartículas contendo ativos em células da linhagem 3T3 (fibroblastos de camundongos Balb-c 3T3), V79 (fibroblastos pulmonares de Hamster) e *Allium cepa*;
- Ensaio de liberação *in vitro* utilizando membranas modelos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- Ivermectina - Pestanal®
- Metopreno - Pestanal®
- Ácido Oleico - Sigma®
- Gliceril Tripalmitato (grau de pureza 85%) - Sigma®
- Poli (Álcool Vinílico) – (PVA) - Sigma®
- Clorofórmio (grau espectroscópico analítico) - Merck®
- Acetonitrila (grau HPLC) – JT Baker®
- Dispositivos de ultrafiltração de celulose regenerada de 30 kDa- Millipore®
- Agitador magnético - Tecnal®
- Microcentrífuga - MiniStar®
- Evaporador rotativo AL 390 - American Lab®
- Bomba à vácuo A12 - Symbol®
- Analisador de partículas Zetasizer Nano ZS 90 – Malvern®
- Microscopia de Transmissão - Zeiss LEO® 906
- Espectrofotômetro de FI-IR 660, Varian® Inc.
- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Varian® Pro Star
- Bomba PS 210 solvent delivery module - Varian®
- Detector UV-Vis PS 210 - Varian®
- Coluna cromatográfica Varian® C18 fase reversa, 5 μ 110A, 250x4,60mm
Injetor manual
- Software Galaxie Workstation

3.2 Preparo de Nanopartículas Lipídicas Sólidas e Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

As NLS e CLN foram preparadas utilizando o processo de emulsão/evaporação de solvente, adaptado de VITORINO *et al.* (2011). Inicialmente, foi preparada uma solução de 30 mL contendo água deionizada com 1,25 % de Poli (Álcool Vinílico), polímero semicristalino utilizado como tensoativo, a qual foi mantida

sob agitação. Em seguida, 250 mg de tripalmitina foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio, nesta mesma fase orgânica foi adicionado 10 mg de IVM ou 10 mg de MTP, então a fase orgânica foi gotejada com o auxílio de uma ponteira na fase aquosa. Esta solução foi então submetida à sonicação durante 5 minutos em sonicador com 40 W de potência resultando em uma pré-emulsão, posteriormente esta pré emulsão foi levada a um ultraturrax, onde foi agitada vigorosamente por 7 minutos a uma velocidade de 14.000 rpm. Após a agitação foi realizado o processo de evaporação do solvente orgânico o qual foi eliminado com o auxílio de um evaporador rotativo e a emulsão foi concentrada até o volume final de 10 mL, obtendo-se NLS com a concentração final de 1 mg/mL de IVM ou MTP.

Para o preparo de CLN, procedeu-se da mesma forma como descrito para NLS, porém em vez de utilizar 250 mg de tripalmitina, utilizou-se 125 mg de tripalmitina e 125 mg de ácido oleico.

3.3 Metodologia analítica de quantificação dos ativos por CLAE

A quantificação dos bioativos existentes nas nanopartículas foi efetuada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), dispondo de um equipamento de CLAE Varian com Sistema controlador, isocrático, detector UV-VIS, injetor automático. As suspensões de nanopartículas previamente filtradas foram injetadas em coluna cromatográfica Phenomenex, Gemini, C₁₈ fase reversa, 5 µm, 110A, 100 x 4,60 mm, eluídas com fase móvel constituída de acetonitrila/água/metanol (250:90:10, v:v:v com 2 % de ácido acético) para ivermectina, e acetonitrila/água (90:10 v:v, com 0,1 % de ácido fosfórico) para metopreno, sendo o bioativos detectado por comprimento de onda específico na região do ultravioleta (UV) (246 nm para IVM e 264 nm para MTP). Foram construídas curvas analíticas para cada bioativo a fim de serem utilizadas para determinação da eficiência de encapsulação e liberação dos bioativos nas nanopartículas lipídicas sólidas. (GRILLO *et al.*, 2012). Para isso, foram utilizadas concentrações de IVM no intervalo de 10 a 500 µg/mL e concentrações de MTP no intervalo de 2,5 a 125 µg/mL.

3.4 Medidas de caracterização e estabilidade das formulações

3.4.1 Diâmetro médio e Polidispersão

3.4.1.1 Medida de diâmetro médio de partículas por espectroscopia de correlação de fótons

A avaliação da distribuição de tamanho das nanopartículas foi realizada diluindo-se as suspensões de partículas com água deionizada (1:1000 v:v) e, empregando um analisador de partículas ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern) sob um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25 °C onde a distribuição de tamanho foi obtida pelo índice de polidispersão. Cada resultado foi expresso como medida de três determinações (GOVENDER *et al.*, 1999; GOVENDER *et al.*, 2000; VENKATRAMAN *et al.*, 2005). Foram realizadas análises estatísticas utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA) para verificar alterações significativas.

3.4.2 Potencial Zeta

A carga das partículas foi avaliada através da determinação de potencial zeta, utilizando-se um analisador de potencial zeta Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern). As avaliações foram efetuadas diluindo-se as suspensões em água deionizada (1:1000 v:v) e os resultados foram expressos como médias de três determinações.

3.4.3 pH e quantificação de Ácidos Graxos Livres

Monitorar o pH de suspensões coloidais em função do tempo traz informações relevantes para indicar a estabilidade química dos componentes da formulação. Variações no pH das formulações podem indicar alterações nestes componentes que podem ser devido à hidrólise química de grupos funcionais presentes nos componentes da formulação. (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O pH das suspensões das nanopartículas lipídicas sólidas foi medido no decorrer de 120 dias e utilizou um para isso um pHmetro (Jenway®, modelo 3510) previamente calibrado com soluções tampão em pH 7,0 e 4,0.

A quantificação de ácidos graxos livres foi realizada a partir do kit de determinação colorimétrica EnzyChrom™ (BioAssay Systems®) no tempo de 30 dias de armazenamento.

3.4.4 Rastreamento de nanopartículas

Para as análises de rastreamento de nanopartículas, os dados foram coletados por meio de uma célula NanoSight LM 10 (laser verde, 532 nm) e uma câmera sCMOS usando software NanoSight (versão 2.3). Para evitar a contaminação das amostras, medições da água deionizada foram realizadas. As suspensões de nanopartículas foram diluídas 30.000 vezes, sendo feitas análises em triplicata para cada amostra. Para garantir que diferentes partículas fossem analisadas, para cada réplica, 1 mL de suspensão da amostra foi injetada na célula volumétrica, com o intuito de deslocar o conteúdo medido anteriormente. Cada repetição foi constituída de cinco medições com aproximadamente 2000 partículas contadas em cada análise. Foram obtidos com resultado final, a distribuição de tamanho das partículas em função da concentração, as quais foram expressas com o desvio padrão (ANDERSON *et al.*, 2013).

3.4.5 Eficiência de encapsulação dos ativos nas formulações

A quantidade do bioativo encapsulado às nanopartículas foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, que se baseia em submeter à suspensão de nanopartículas à centrifugação em dispositivos de ultrafiltração constituídos de celulose regenerada de 10 kDa (Microcon – Millipore®) e quantificar o ultrafiltrado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (GAMISANS *et al.*, 1999; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; KILIC *et al.*, 2005), como descrito no item 3.3.

O princípio da técnica consiste em que apenas o ativo livre consegue atravessar a membrana de celulose, portanto, pela diferença entre a quantidade de fármaco utilizada (100 %) e a quantidade não associada às nanopartículas conseguimos precisar a eficiência de fármaco encapsulado nas nanopartículas.

A eficiência de encapsulação (% EE) foi determinada através da equação (1):

$$\%EE = \frac{A}{B} \times 100 \quad (1)$$

onde A corresponde a quantidade do ativo encapsulada nas partículas e B a quantidade inicial de ativo adicionada às formulações.

3.4.6 Ensaio de liberação *in vitro*

Com o propósito de verificar o perfil de liberação dos ativos pelas nanopartículas foi realizado ensaio de cinética de liberação. A liberação dos fármacos (IVM e MTP) através das nanopartículas foi modificado baseando-se no método descrito por ASRAR *et al.* (2004). Os ensaios foram realizados em condição de diluição “sink”, onde o volume do meio de dissolução é grande o suficiente para que a concentração de fármaco presente não atinja os 10 % (m/v) do valor de sua concentração de saturação (PAAVOLA *et al.*, 1995). Sendo assim, 0,7 mL da suspensão de nanopartículas contendo IVM foi diluído em 700 mL de água deionizada, enquanto 0,3 mL da suspensão de nanopartículas contendo MTP foi diluído em 857 mL de água deionizada. Alíquotas de 10 mL destas misturas foram então colocadas em tubos Falcon fechados e submetidos à agitação em shaker (150 rpm) em temperatura ambiente. Em períodos de 15, 30, 45 e 60 min, ao longo de 180 minutos, um tubo era removido do shaker, submetido a centrifugação para a sedimentação das nanopartículas, e o sobrenadante era filtrado através de um filtro de 0,45 µm e quantificados por CLAE segundo metodologia descrita no item 3.3. Os valores de área obtidos foram convertidos em concentração de ativo em µg/mL, utilizando como padrão uma solução dos ativos livres. As medidas foram realizadas em triplicata.

3.5 Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

As análises de FTIR foram realizadas para investigar possíveis interações entre os fármacos e os carreadores. Os experimentos foram realizados em um espectrofotômetro de FT-IR 660 Varian® em uma faixa de 400 a 4000 cm⁻¹,

utilizando 128 varreduras por amostra com resolução de 2 cm^{-1} (POLLETO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2011). As amostras dos ativos (IVM e MTP), da tripalmitina, do ácido oleico e das nanopartículas (NLS e CLN) sem e contendo os ativos, assim como a mistura física entre os componentes foram analisadas utilizando o acessório de reflectância total atenuada (ATR), o qual permite a análise de compostos em pó, em pastas e aqueles que não podem ser analisados em forma de pastilhas ou filmes.

3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A morfologia das NLS e CLN foram verificadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (Zeiss-LEO 906) conforme o método previamente descrito (JOREZ *et al.*, 2004). Uma pequena alíquota da suspensão de nanopartículas foi colocada em grades de cobre de 200 malhas por 15 min. Uma solução de acetato de uranila à 2% foi utilizada como contraste, sendo esta gotejada sobre a grades e posterior remoção do excesso utilizando um papel. Após o preparo das amostras, as mesmas foram analisadas no microscópio a uma voltagem de 80 kV.

3.7 Ensaio de cito e genotoxicidade

3.7.1 Citotoxicidade - Teste de redução do tetrazolium MTT (Método colorimétrico)

Os testes de viabilidade celular foram realizados em células da linhagem 3T3 (fibroblastos de camundongos Balb-c 3T3), V79 (fibroblastos pulmonares de Hamster) e, mantidas em cultura contínua em meio de cultura DMEN suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 1% de penicilina/sulfato de estreptomicina, pH 7,4, 37 °C, sob atmosfera úmida com 5 % de CO₂. O plaqueamento foi realizado inoculando-se 1×10^4 células por poço em placas de 96 poços, incubadas por 24 horas até a aderência. Após a aderência as células foram expostas durante 24 horas às formulações de nanopartículas sem e contendo os fármacos, em concentrações variando na faixa de 0 a 50 µg/mL. A viabilidade celular foi determinada através do teste de redução do 3(4-5 dimetiltiliazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólico (MTT). As células foram incubadas com MTT (0,5 mg/mL) durante 3 horas a 37 °C. O número de células viáveis foi determinada através da medição da quantidade de

MTT a formazam (composto purpura) pelas desidrogenases mitocondriais. Os cristais de formazam formados foram dissolvidos em DMSO a temperatura ambiente. A absorbância da solução em cada cavidade foi medida em leitor de placas (Labsystems Multiskan MS) em 570 nm e, calculou-se as porcentagens de células viáveis (DE LIMA *et al.*, 2010; DE LIMA *et al.*, 2012).

3.7.2 – Genotoxicidade

O teste de genotoxicidade foi realizado utilizando-se sementes de *Allium cepa*, no qual 30 sementes foram colocadas para germinar em placa de petri contendo água destilada. Ao atingirem o tamanho entre 15 e 20 mm foram utilizadas para o teste. As raízes foram retiradas e expostas por 24h às formulações de nanopartículas sem e contendo os fármacos. Após a exposição as raízes foram fixadas em fixador de Carnoy durante 24h. Após a fixação, as raízes foram removidas da solução fixadora e lavadas por três vezes com água destilada para remoção do excesso de fixador. Em seguida, as raízes foram submetidas a uma hidrólise ácida a 60°C, onde as raízes foram colocadas em banho Maria a 60°C durante 9 minutos em uma solução de HCl 1 Molar. Após esta etapa, as raízes foram retiradas do banho e lavadas com água destilada por aproximadamente 5 minutos cada uma, e colocadas em reativo de Schiff durante 2h para coloração. Após esse tempo, as raízes passaram por 3 banhos de água destilada até ser retirado todo o excesso do corante. Cortou-se a região meristemática das raízes e colocada em lâmina com uma gota de Carmim Acético 2% (corante citoplasmático), e em seguida, colocou-se a lamínula, e suavemente feito o esmagamento para espalhar as células. Após o preparo das lâminas realizou-se a observação ao microscópio com a contagem e classificação das células.

Para este estudo utilizou-se amostras dos ativos (IVM e MTP) e dos nanocarreadores (NLS e CLN) contendo e sem os ativos nas concentrações de 1 mg/mL. Como controle, utilizou-se água destilada. O teste de genotoxicidade foi realizado em triplicata.

3.8. Teste de permeação em membranas modelos

O teste de permeação em membranas são usados para estudar a cinética de transferência dos ativos através a pele e outras barreiras biológicas. Para os testes de permeação *in vitro* foram utilizadas células de difusão vertical do tipo Franz (área de permeação de 1,7 cm²) (Sistema Microette Plus Hanson Research). Em cada ensaio, o compartimento doador da célula foi preenchido com 1 mL de cada formulação, enquanto o compartimento receptor preenchido com 7 mL de tampão Hepes 20 mM com NaCl 154 mM. Como modelo de barreira foi utilizada uma membrana de nitrocelulose com poro de 50 nm impregnadas com miristato de isopropila (100 µL), de forma a simular a hidrofobicidade do estrato córneo (JANTHARAPRAPAP; STAGNI, 2007). Em intervalos pré-estabelecidos, foram retiradas alíquotas da solução receptora (1 mL) e analisadas por CLAE, conforme método descrito anteriormente no item 3.3.

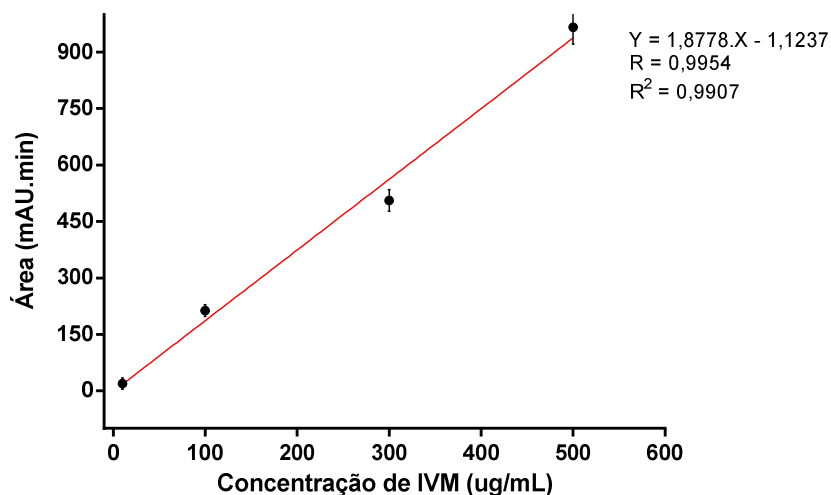
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Medidas de caracterização e estabilidade das formulações

4.1.1 Quantificação dos ativos por CLAE

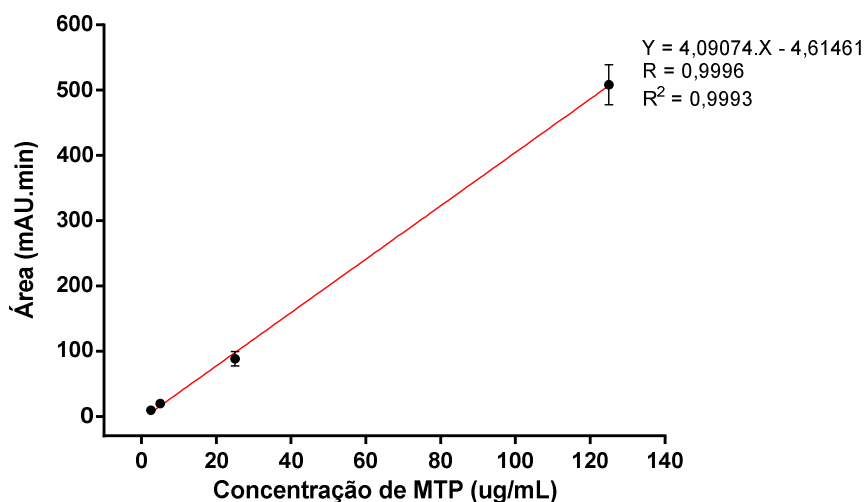
A fim de obter uma metodologia para quantificação de ivermectina foi construída uma curva de calibração deste ativo, conforme as condições descritas no item 3.3, sendo esta apresentada na Figura 6. O coeficiente de correlação linear para a curva média (n=3) foi de 0,9954. Foram obtidos limites de detecção e de quantificação para a Ivermectina de 0,16 mg/mL e 0,53 mg/mL, respectivamente.

Figura 6 – Curva padrão da Ivermectina base para quantificação do ativo por CLAE obtido sob as condições cromatográficas: coluna C_{18} fase reversa, fase móvel constituída por acetronitrila/água/metanol, volume de injeção de 100 μ L, leitura em triplicata.



Assim como realizado para a Ivermectina, foi construída também uma curva analítica para o Metopreno (Figura 7) conforme as condições descritas no item 3.3, onde a mesma apresentou um coeficiente de correlação de 0,9996. Foram obtidos limites de detecção e de quantificação para o Metopreno de 0,006 mg/mL e 0,019 mg/mL, respectivamente.

Figura 7 – Curva padrão da Metopreno base para quantificação do ativo por CLAE obtido sob as condições cromatográficas: coluna C_{18} fase reversa, fase móvel constituída por acetronitrila/água, volume de injeção de 20 μ L, leitura em triplicata.



A partir das curvas analíticas obtidas através das metodologias analíticas utilizadas serão realizadas as quantificações dos ativos nas formulações, bem como para realização dos ensaios de liberação.

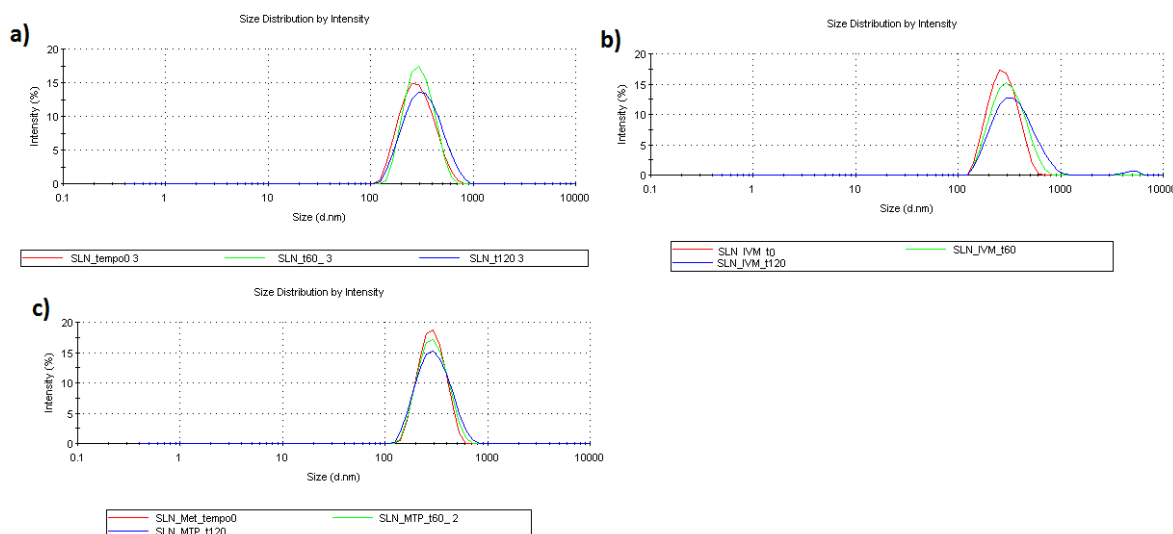
4.1.2 Diâmetro médio e Polidispersão

O tamanho e a polidispersão de nanopartículas lipídicas podem ser afetados por inúmeros parâmetros como: a constituição da formulação (tipo de lipídio, tipo de ativo, tipo de surfactante, entre outros), o método e as condições de preparo (temperatura, agitação, pressão, entre outros) e armazenamento (MARCATO, 2009).

As análises de distribuição de tamanho para as nanopartículas mostraram o perfil monomodal das mesmas, ou seja, a existência de apenas uma população de nanopartículas, tanto na análise de NLS como de CLN. Isto é de grande importância, pois se busca em formulações para liberação modificada, uma maior homogeneidade do sistema, para que ocorram menores interferências no processo de liberação dos ativos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MARCATO, 2009; MEHNERT; MÄDER, 2001).

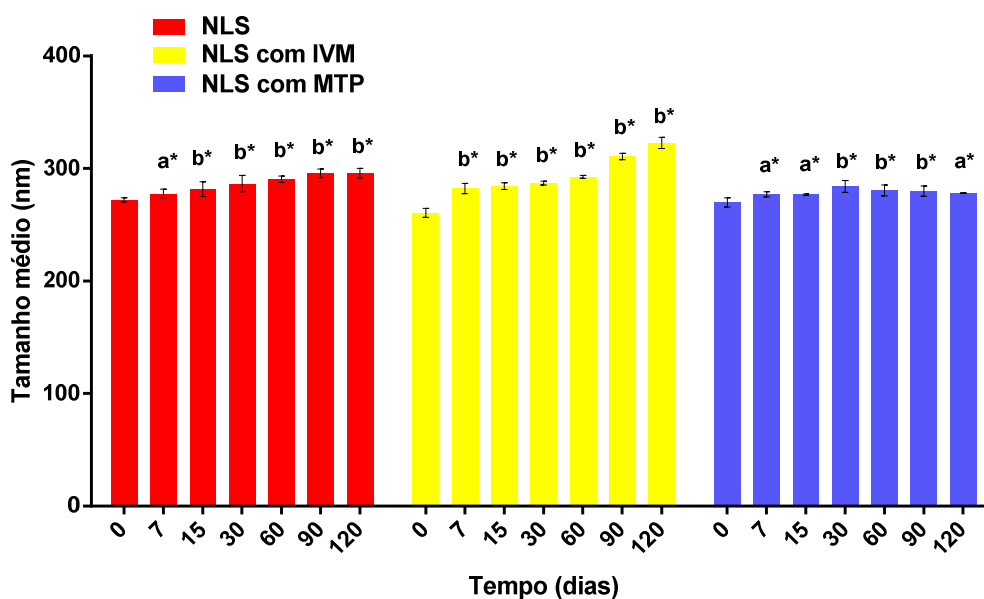
A Figura 8 retrata a distribuição de tamanho de NLS na ausência e na presença dos fármacos IVM e MTP no tempo inicial de estabilidade (0 dias), no tempo intermediário (60 dias) e no tempo final (120 dias). Observa-se (Figura 8 – A) que não houve alteração significativa de tamanho durante o período de estocagem. Este perfil de distribuição foi semelhante para as NLS contendo MTP (Figura 8 - B), no entanto, para o tempo de 120 dias pode-se observar o aparecimento de uma população com tamanho ao redor de 1000 nm, podendo indicar a presença de algum fenômeno de agregação. Para as NLS contendo IVM (Figura 8 – C) pode-se observar uma pequena alteração no perfil de distribuição de tamanho da formulação. Pode-se observar que durante o tempo de estocagem ocorreu variação na intensidade do tamanho da partícula analisada, o que pode sugerir possível formação de agregados.

Figura 8 – Distribuição de tamanho de NLS para os tempos 0, 60 e 120 dias na ausência de fármacos (a), contendo IVM (b) e contendo MTP (c).



A Figura 9 apresenta a variação do tamanho médio das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) com e sem os ativos IVM e MTP.

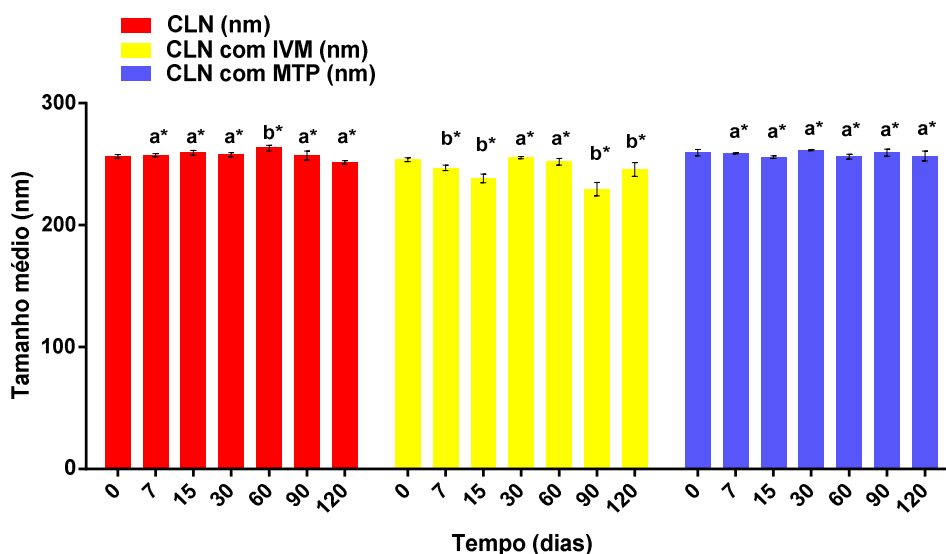
Figura 9 – Tamanho médio das NLS com e sem IVM e MTP em função do tempo. As medidas foram realizadas em triplicada (n=3). Utilizou-se o teste ANOVA para verificação de alterações significativas, sendo considerada uma significância de $p < 0,05$ para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos, onde **a*** representa variações não significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero; **b*** representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero.



Como observado nas Figuras 8 e 9, as formulações de NLS sem os ativos e com os ativos apresentaram estabilidade durante o período estudado, sofrendo alterações significativas: na formulação de NLS com IVM ocorreram alterações significativas em seu tamanho no período de estudo, sendo observadas estas alterações em todo o decorrer de estocagem. Este aumento no tamanho pode estar associado à possível formação de agregados. Já as formulações de NLS contendo MTP apresentaram alterações significativas a partir de 30 dias de estocagem. De modo geral, o diâmetro médio as formulações de NLS, NLS com IVM e NLS com MTP foi de $285,6 \pm 15,8$ nm; $291,3 \pm 34,3$ nm e $277,9 \pm 12,9$ nm, respectivamente. OLIVEIRA *et al.* (2015), em análise de tamanho de partícula de NLS com ativos atrazina e simazina observaram o mesmo perfil de alteração no tamanho médio em função do tempo.

Já a Figura 10 apresenta a variação do tamanho médio das formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) com e sem os ativos ivermectina (IVM) e metopreno (MTP).

Figura 10 – Tamanho médio dos CLN com e sem IVM e MTP em função do tempo. As medidas foram realizadas em triplicada ($n=3$). Utilizou-se o teste ANOVA para verificação de alterações significativas, sendo considerada uma significância de $p<0,05$ para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos, onde **a*** representa variações não significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero; **b*** representa variações significativas entre os grupos em função do tempo em relação ao controle no tempo zero.



Como observado na Figura 10, as formulações de CLN sem os ativos não apresentaram alterações significativas durante o período de estocagem, exceto no tempo de 60 dias. As formulações contendo MTP também não apresentaram alterações significativas durante o tempo de estudo. Já as formulações de CLN com IVM apresentaram alterações significativas de tamanho durante o período de estocagem. De modo geral, as formulações apresentaram tamanho médio geral de $257,5 \pm 7,4$ nm; $245,9 \pm 22,4$ nm; e $258,3 \pm 4,9$ nm para as formulações de CLN, CLN com IVM e CLN com MTP, respectivamente.

Observa-se que tanto as formulações de NLS como as de CLN apresentaram no tempo inicial um tamanho médio abaixo de 300 nm, destacando a eficiência do método de preparo das partículas. Pode-se observar também que as formulações de NLS apresentaram maior tamanho quando comparadas às formulações de CLN. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que os CLN são formados por lipídios sólidos e líquidos, enquanto as NLS são formadas apenas por lipídio sólido.

Segundo RAI *et al.* (2008), lípidos com ponto de fusão mais elevados podem originar um aumento no tamanho das nanopartículas. Como o ácido oleico apresenta ponto de fusão entre 13 e 14 °C (YUAN *et al.*, 2007), e a tripalmitina entre 61 e 65 °C (OLBRICH *et al.*, 2002), e os CLN apresentam 50 % da massa de tripalmitina presente nas NLS, as formulações de CLN apresentam menores tamanhos durante o período de estocagem, como observa-se nas Figuras 9 e 10.

A polidispersão também foi analisada durante o período de estudo. A polidispersão representa a variabilidade do tamanho da partícula. Nas Figuras 11 e 12 estão representadas as variações de polidispersão das formulações de NLS e CLN com e sem IVM e MTP.

Figura 11 – Polidispersão média de NLS com e sem IVM e MTP em função do tempo.

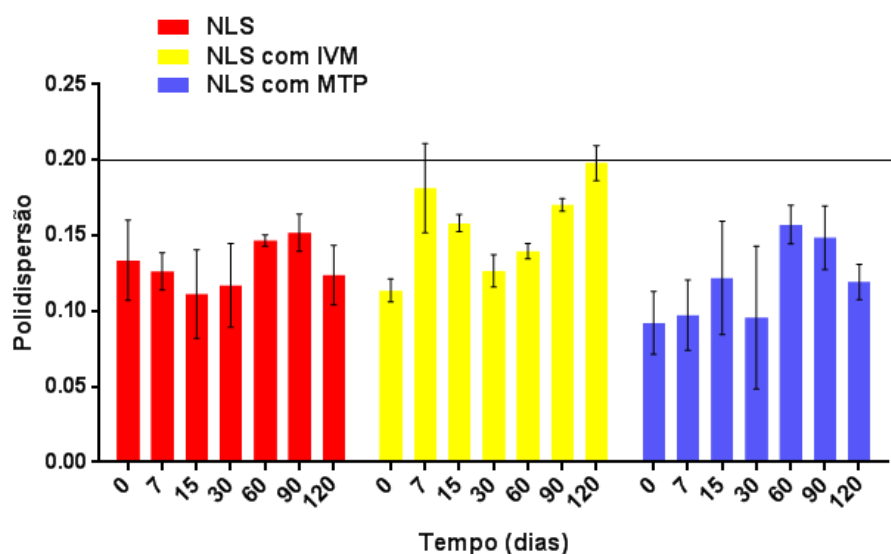
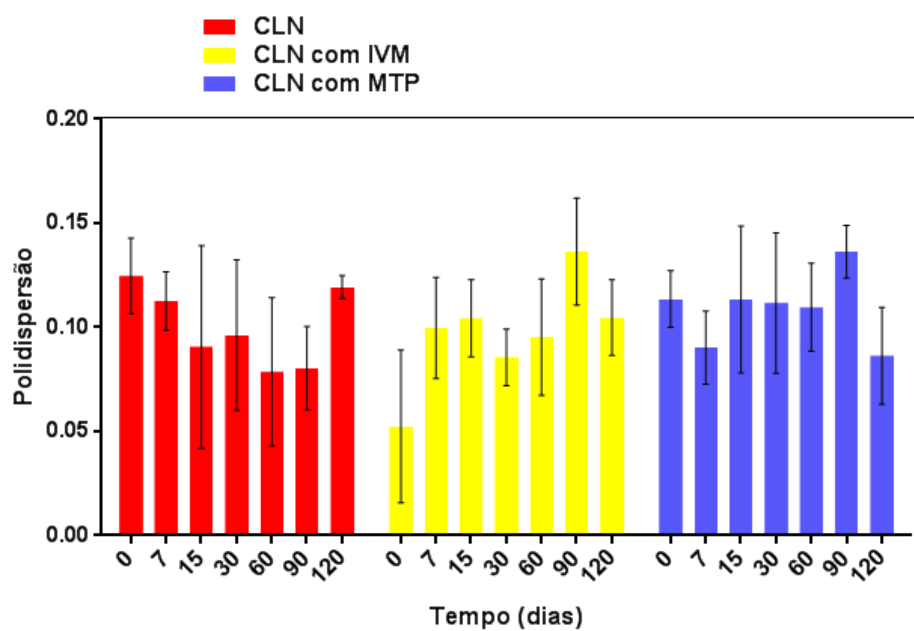


Figura 12 – Polidispersão média de CLN com e sem IVM e MTP em função do tempo.



Índices de polidispersão inferior a 0,1 são tipicamente referidos como “monodisperso”. Quanto maior o índice de polidispersão, maior será a variação de tamanho das partículas na formulação (NANOCOMPOSIX, 2012). Valores abaixo de 0,2 para o índice de polidispersão são considerados bons indicadores de estabilidade (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

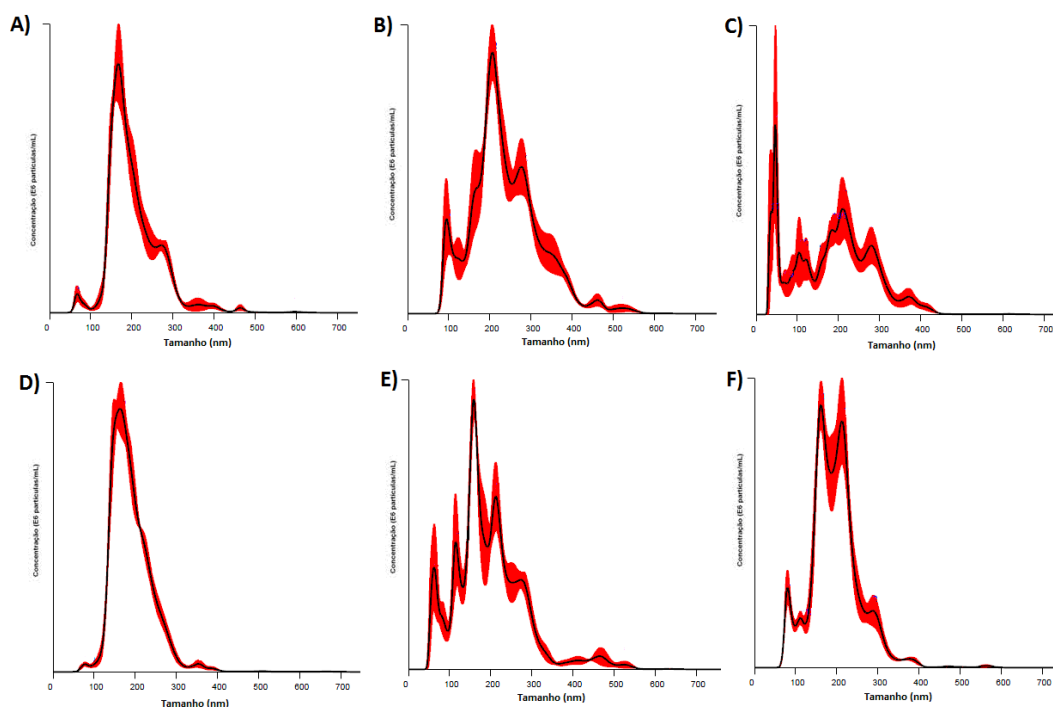
Observa-se que ocorreram variações na polidispersão em função do tempo, no entanto, estas variações podem estar relacionadas à reorganização na distribuição de tamanho das partículas durante o período de armazenagem, porém todas as formulações apresentaram valores abaixo de 0,2, o que evidencia boa estabilidade das formulações. A polidispersão média das formulações de NLS, NLS com IVM, NLS com MTP, CLN, CLN com IVM e CLN com MTP foi 0,130; 0,164; 0,119; 0,100; 0,097; e 0,109, respectivamente. Estes resultados demonstram que tanto as formulações de nanopartículas na ausência ou contendo os fármacos IVM e MTP apresentam boa estabilidade.

Assim como o tamanho, a polidispersão sofre aumento quando comparamos os valores das formulações de CLN com as de NLS. Isso ocorre devido à variação da concentração do lipídio sólido (tripalmitina), como descrito no item 1.3.2.

4.1.3 Rastreamento de nanopartículas

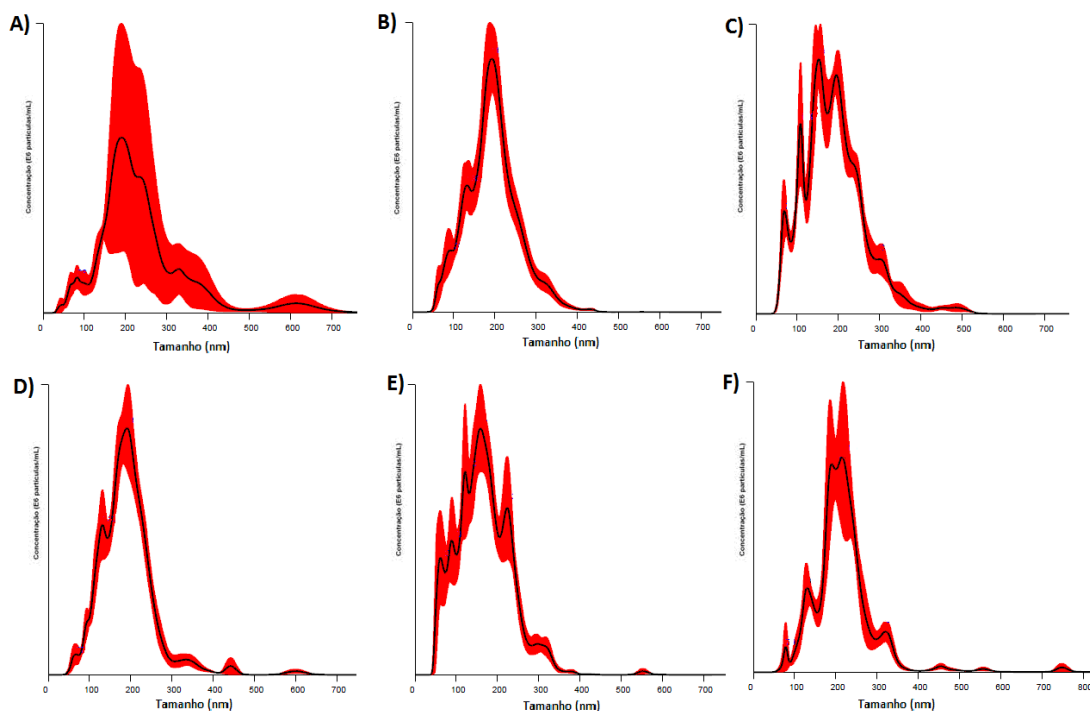
A técnica de rastreamento de nanopartículas foi utilizada para caracterizar as suspensões de NLS e CLN. As análises de distribuição de tamanho das partículas são apresentadas nas Figuras 13 e 14. No tempo inicial (0 dias), observa-se que para as NLS na ausência dos ativos foi obtido um diâmetro hidrodinâmico de $203,7 \pm 65,5$ nm e uma concentração de $2,49 \pm 0,12 \times 10^{13}$ partículas por mL. Para as NLS contendo os ativos IVM e MTP, foram obtidos diâmetro médios de $237,3 \pm 83,6$ nm e $185,1 \pm 98,3$ nm, e concentração de $4,32 \pm 0,3 \times 10^{13}$ e $7,47 \pm 1,14 \times 10^{13}$ partículas por mL, respectivamente. Para os CLN na ausência dos ativos, o diâmetro médio apresentado foi de $191,1 \pm 52,2$ nm e concentração de $5,43 \pm 0,06 \times 10^{13}$ partículas por mL. Para os CLN com os ativos IVM e MTP o diâmetro médio apresentado foi de $196,5 \pm 87,1$ nm e $196,3 \pm 62,3$ nm, e a concentração foi de $4,35 \pm 0,3 \times 10^{13}$ e $4,53 \pm 0,09 \times 10^{13}$ partículas por mL, respectivamente.

Figura 13 – Distribuição de tamanho das partículas em função da concentração no tempo de 0 dias. A) NLS; B) NLS contendo IVM; C) NLS contendo MTP; D) CLN; E) CLN contendo IVM e CLN contendo MTP. As análises foram realizadas a 25°C. A linha vermelha é correspondente ao desvio padrão das análises.



Já para o tempo de 120 dias, para as NLS na ausência dos ativos foi obtido um diâmetro médio de $258,2 \pm 170,6$ nm e concentração de $5,31 \pm 3,18 \times 10^{13}$ partículas por mL, respectivamente. Para as NLS contendo os ativos IVM e MTP, foram obtidos diâmetro médios de $193,7 \pm 63,4$ nm e $188,6 \pm 76,3$ nm, e concentração de $2,10 \pm 0,15 \times 10^{13}$ e $2,35 \pm 0,09 \times 10^{13}$ partículas por mL. Para os CLN na ausência dos ativos o diâmetro médio encontrado foi de $193,1 \pm 78,2$ nm e concentração de $1,68 \pm 0,05 \times 10^{13}$ partículas por mL. Para os CLN com os ativos IVM e MTP, o diâmetro médio encontrado foi de $167,8 \pm 75,9$ nm e $222,3 \pm 97,7$ nm e concentração de $4,32 \pm 0,6 \times 10^{13}$ e $3,18 \pm 0,24 \times 10^{13}$ partículas por mL, respectivamente.

Figura 14 – Distribuição de tamanho das partículas em função da concentração no tempo de 120 dias. A) NLS; B) NLS contendo IVM; C) NLS contendo MTP; D) CLN; E) CLN contendo IVM e CLN contendo MTP. As análises foram realizadas a 25°C. A linha vermelha é correspondente ao desvio padrão das análises.



Como se pode observar na Tabela 2, que, para ambas as técnicas (ECF e NTA), foram obtidos valores semelhantes para a distribuição de tamanho. Eventuais diferenças podem ser devido a forma de realização de análises, em especial em relação a questão de diluição das amostras. O NTA, as amostras são diluídas em 30.000 vezes enquanto na ECF a diluição é realizada em 1.000 vezes. Tais diferenças em diluições podem fazer com que eventuais agregados sejam desfeitos e isso faz com que em geral os valores de NTA sejam menores que os observados por ECF.

Tabela 2 – Comparação entre os valores obtidos para a distribuição de tamanho obtidos a partir das técnicas de ECF e NTA para NLS e CLN sem e contendo IVM e MTP, nos tempos de 0 e 120 dias.

Nanopartícula	Tempo (dias)	ECF (nm)	NTA (nm)
NLS	0	271,9 ± 2,1	203,7 ± 65,5
NLS	120	295,7 ± 4,0	258,2 ± 170,6
NLS + IVM	0	260,4 ± 3,5	237,3 ± 83,6
NLS + IVM	120	322,5 ± 5,0	193,7 ± 63,4
NLS + MTP	0	269,7 ± 4,7	185,1 ± 98,3
NLS + MTP	120	277,9 ± 0,3	188,6 ± 76,3
CLN	0	256,4 ± 1,2	191,1 ± 52,2
CLN	120	251,6 ± 1,4	193,1 ± 78,2
CLN + IVM	0	253,7 ± 1,7	196,5 ± 87,1
CLN + IVM	120	245,8 ± 4,7	167,8 ± 75,9
CLN + MTP	0	259,5 ± 1,7	196,3 ± 62,3
CLN + MTP	120	256,8 ± 3,4	222,3 ± 97,7

4.1.4 Potencial Zeta

Outro parâmetro avaliado para acompanhar a estabilidade das formulações foi o potencial zeta. Ele reflete a carga de superfície das nanopartículas, sendo influenciado pela constituição da partícula, o meio dispersante, pH e a força iônica do meio (GREENWOOD, 2003). Geralmente quando maior o valor numérico (em módulo) do potencial zeta, maior será a estabilidade das suspensões coloidais, pois a força de repulsão de cargas entre as partículas é maior, evitando agregação.

As Figuras 15 e 16 apresentam os valores do potencial zeta para as formulações de NLS e CLN com e sem os fármacos. As formulações apresentaram valores médios de potencial zeta de -18,1; -14,7; -15,6; -18,8; -20,9; e -20,7mV para NLS, NLS com IVM, NLS com MTP, CLN, CLN com IVM e CLN com MTP, respectivamente.

Figura 15 – Potencial zeta de NLS com e sem IVM e MTP em função do tempo de 120 dias.

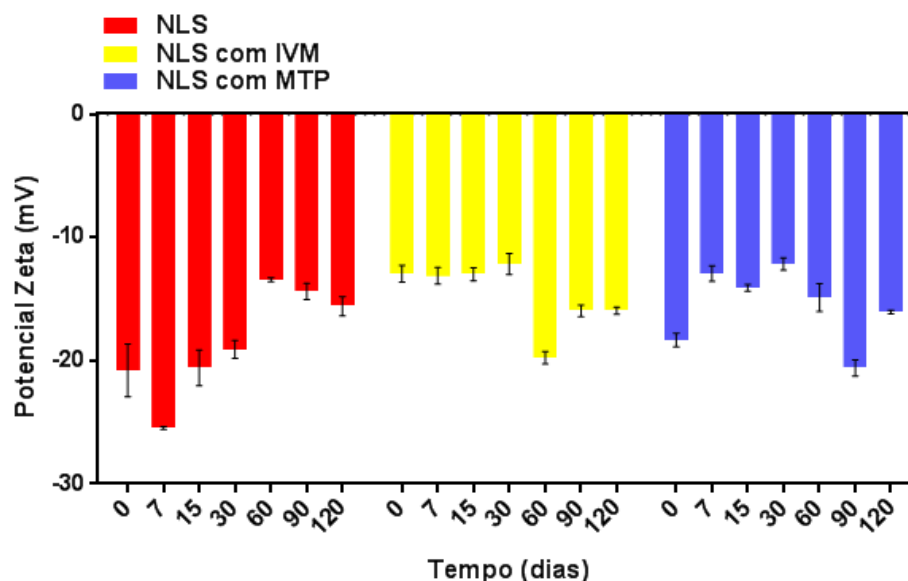
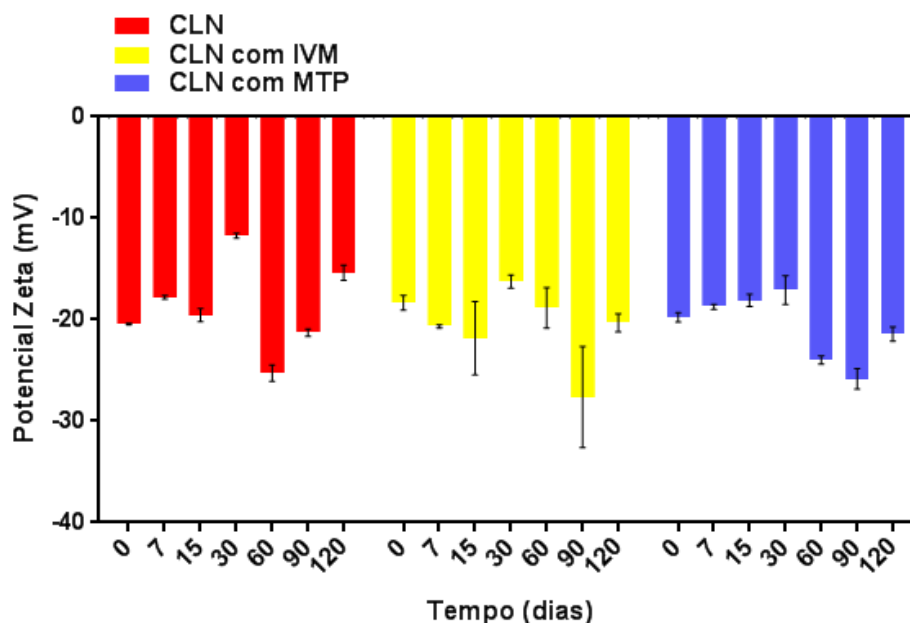


Figura 16 – Potencial zeta de CLN com e sem IVM e MTP em função do tempo de 120 dias.



No preparo das formulações, utilizou-se álcool polivinílico como tensoativo e este possui uma ação estabilizante, ou seja, adsorve sobre a superfície das partículas criando uma camada estabilizadora por efeito estérico, a qual provoca a redução do potencial zeta medido (MOSQUEIRA *et al.*, 2000; MARIN *et al.*, 2013). Desta forma, o principal fator de estabilização destas partículas é determinado pela presença do tensoativo e não pelo valor do potencial zeta. Assim, os valores de

potencial zeta nessas formulações não indicam, necessariamente, uma baixa estabilidade.

Mesmo com o efeito estabilizante do PVA, pode-se observar que em função do tempo para os dois carreadores (contendo ou não os ativos) não foram observadas grandes alterações nos valores de potencial zeta, sendo os valores entre -14 mV e -25 mV.

Resultados semelhantes foram observados para nanopartículas lipídicas contendo herbicidas e fungicidas, onde indicou-se que o potencial zeta não foi afetado pela presença dos ativos, o que sugere que estes se encontravam principalmente no interior das nanopartículas.

4.1.5 pH e quantificação de Ácidos Graxos Livres

O pH foi um dos parâmetros investigados para avaliar a estabilidade das NLS e dos CLN na presença e ausência dos fármacos. As alterações no pH podem ser indicativas de degradação dos fármacos e ou de componentes da formulação (SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003) e, por isso acompanhamos as variações de pH das formulações de NLS e CLN durante armazenagem. Nas Figuras 17 e 18 estão representadas as variações de pH das formulações com e sem os ativos IVM e MTP. Pode-se observar que ocorreram pequenas variações de pH nas formulações durante o tempo de armazenagem de 120 dias. Constata-se também que as formulações de NLS apresentaram uma tendência de aumento no valor do pH enquanto as formulações de CLN apresentaram uma tendência de diminuir o valor do pH. Isto pode estar relacionado à composição da fase lipídica de cada formulação.

As formulações de NLS sofreram diminuição na variação de pH quando ocorreu a encapsulação dos ativos comparando-se com a nanopartícula na ausência destes. Já as formulações de CLN não apresentaram grandes alterações de pH entre as nanopartículas com os ativos encapsulados e na ausência destes.

Figura 17 – pH das NLS com e sem IVM e MTP em função do tempo de 120 dias.

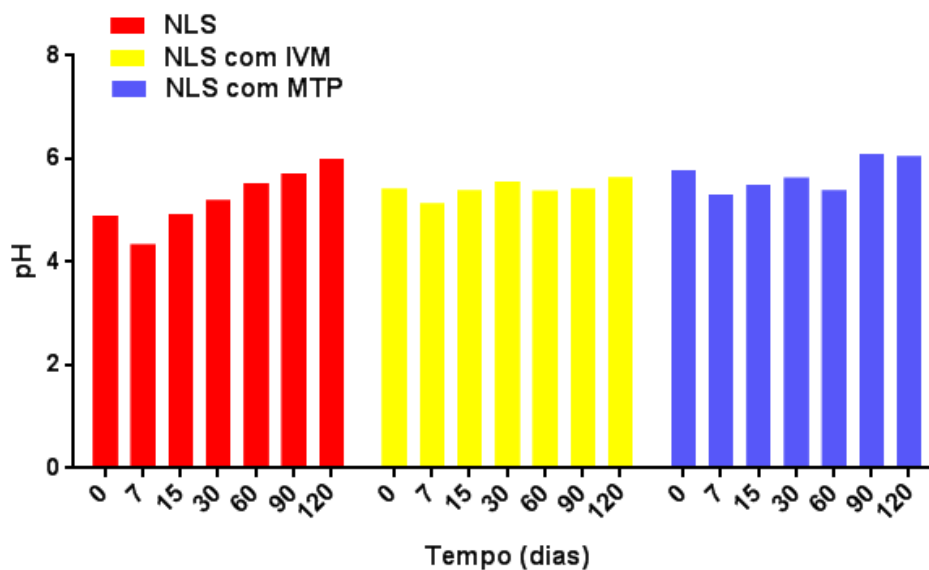
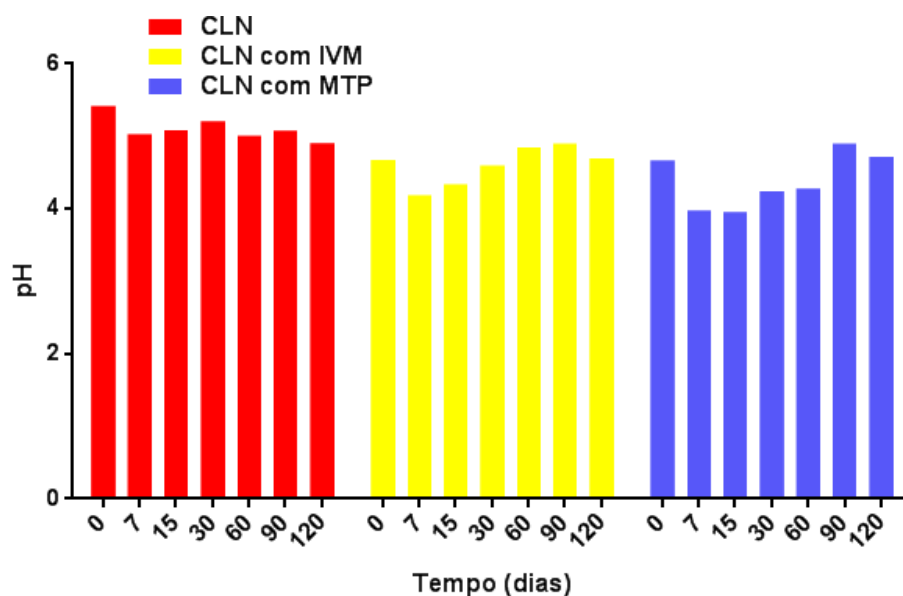


Figura 18 – pH das CLN com e sem IVM e MTP em função do tempo de 120 dias.



A fim de verificar a diferença entre os lipídios utilizados no preparo das amostras, foram realizadas análises de quantificação de ácidos graxos livres (ácido palmítico) a fim de verificar a estabilidade do lipídio tripalmitina nas nanopartículas com tempo de armazenamento de 30 dias. Os resultados estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 – Quantificação de ácidos graxos livres (ácido palmítico) no tempo de 30 dias de armazenamento.

Formulação	NLS + IVM	NLS + MTP	CLN + IVM	CLN + MTP
[Ácido graxo] μM	$93,49 \pm 12,74$	$84,48 \pm 11,59$	$50,88 \pm 12,75$	$39,40 \pm 5,79$

Observa-se que as formulações de NLS apresentam valores maiores que os de CLN. Estes valores demonstram que o lipídio tripalmitina sofre hidrólise ao longo do tempo, podendo ter ocasionado alterações no equilíbrio do meio, uma vez que a liberação de ácidos graxos causariam uma diminuição no pH, no entanto pode-se observar que para as amostras que apresentam maior valor de ácidos graxos também apresentam maiores valores de pH, o que pode indicar que outros processos de hidrólise possam estar ocorrendo no meio, sendo necessário para melhor entendimento deste processo, estudos adicionais.

4.1.6 Caracterização de possíveis interações entre fármacos e os sistemas carreadores por Infravermelho

A fim de caracterizar as possíveis mudanças de conformação das moléculas presentes nas formulações, analisou-se o espectro de infravermelho. As amostras secas foram colocadas no dispositivo para análise sem tratamento prévio. Os resultados podem ser observados nas Figuras 19, 20 e 21. Os espectros foram adquiridos utilizando acessório de reflectância total atenuada (ATR), com um total de 32 acumulações na faixa de frequência de 4000 a 400 cm^{-1} .

Figura 19 – Espectros de infravermelho para tripalmitina, ácido oleico e mistura física entre tripalmitina e ácido oleico. As setas indicam em cada espectro as principais bandas de absorção características.

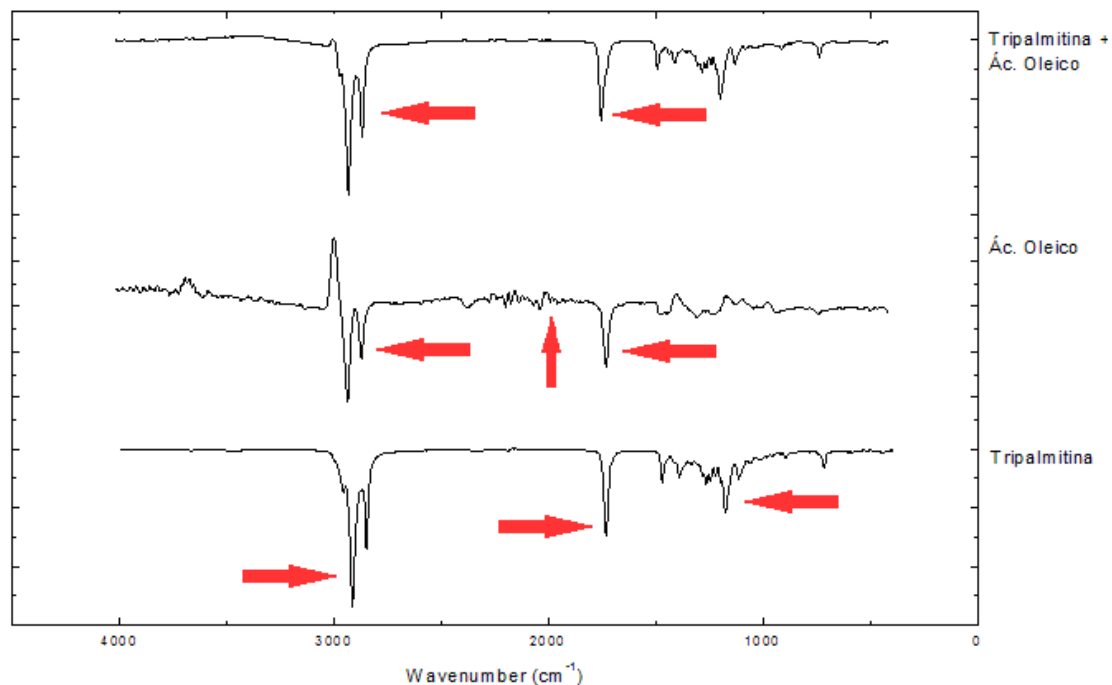


Figura 20 – Espectros de infravermelho para NLS com os ativos IVM (a) e MTP (b). As setas indicam em cada espectro as principais bandas de absorção características.

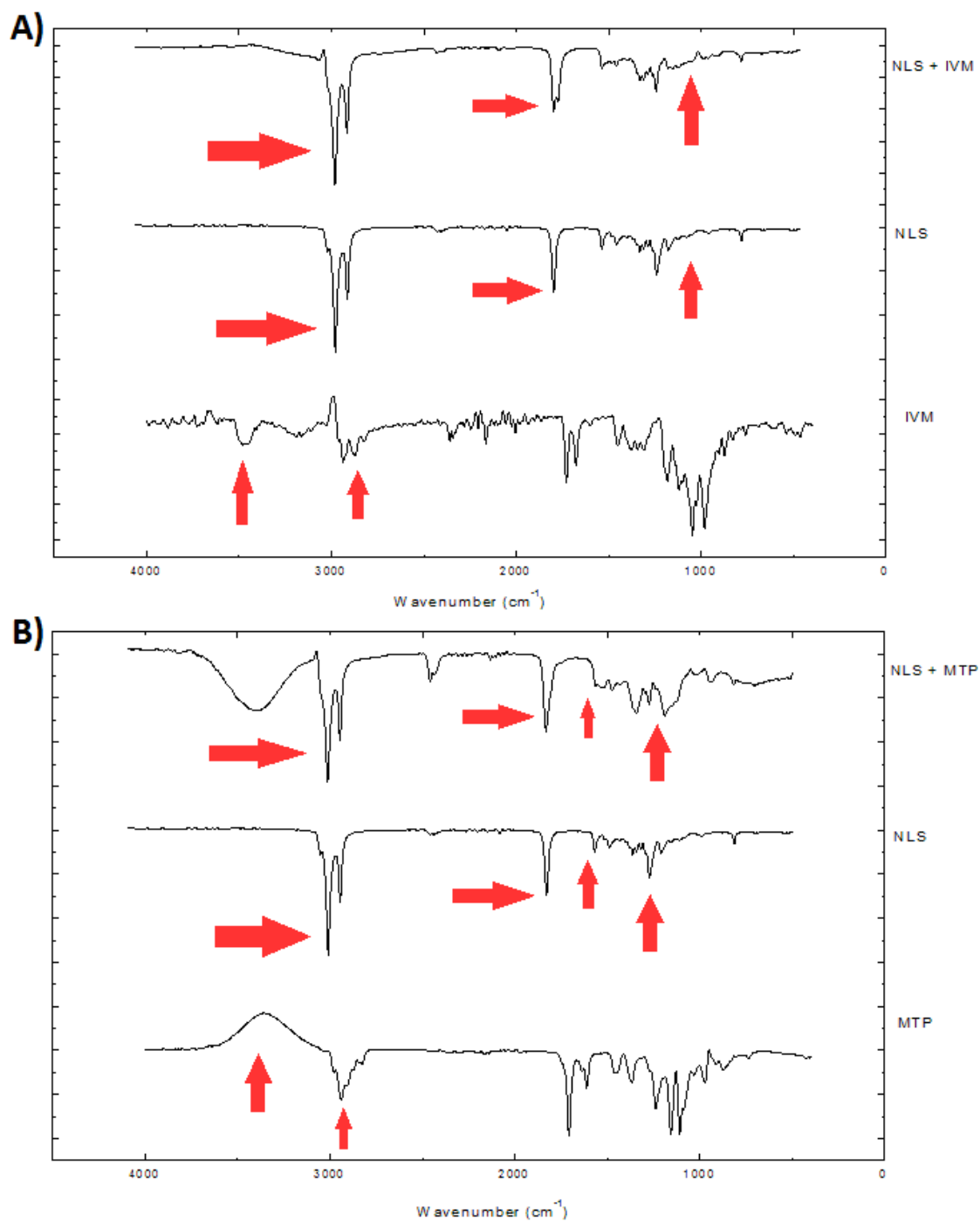
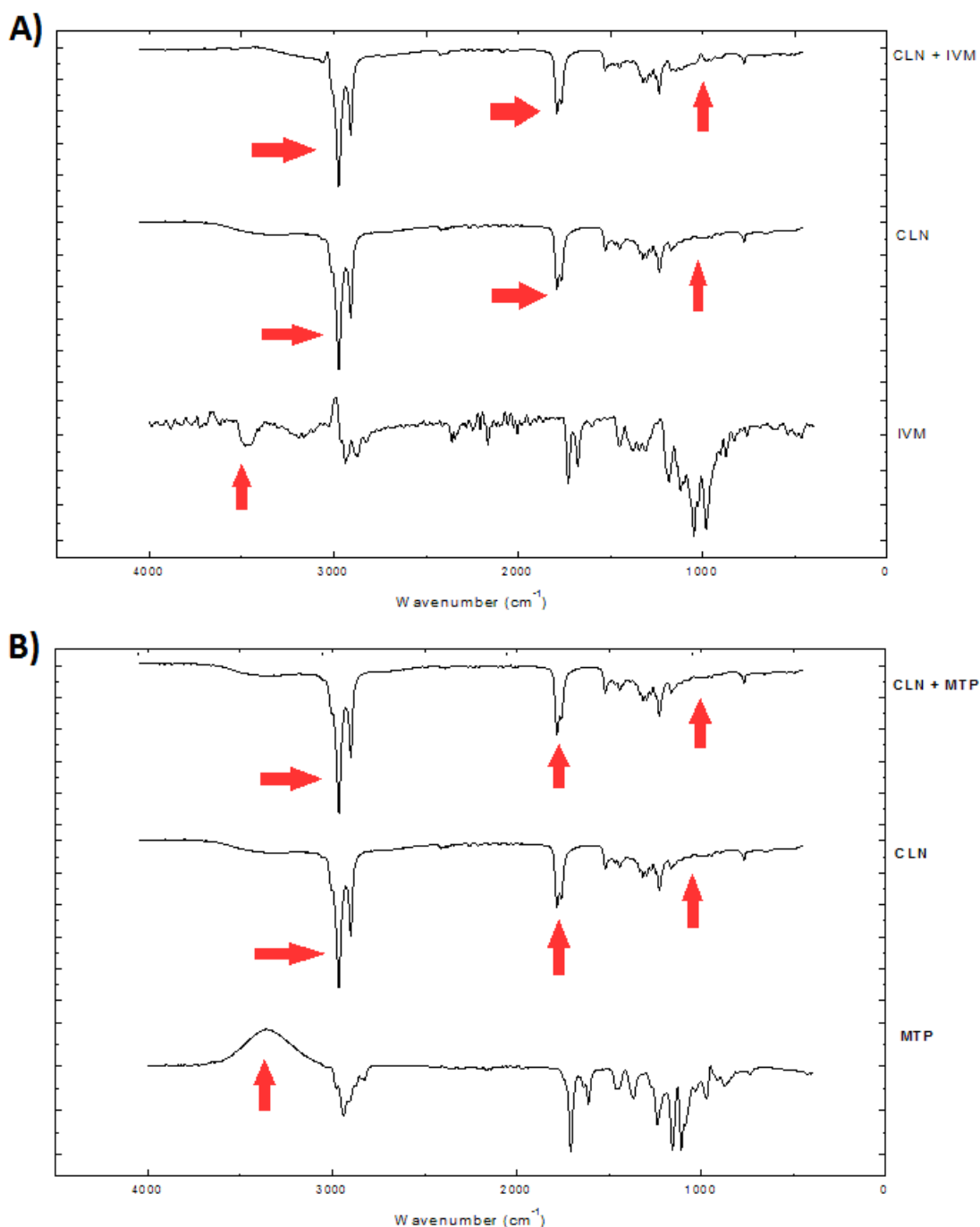


Figura 21 – Espectros de infravermelho para CLN com os ativos IVM (a) e MTP (b). As setas indicam em cada espectro as principais bandas de absorção características.



Na Figura 19 observa-se os espectros de tripalmitina, ácido oleico e a mistura física entre tripalmitina e ácido oleico. No espectro de tripalmitina observa-se bandas específicas como em 2914 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-H do grupo alquila, em 1733 cm^{-1} o espectro do estiramento da ligação C=O da função éster. No espectro de ácido oleico também pode-se observar bandas

específicas como em 2914 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-H do grupamento alquila, em 2572 cm^{-1} a deformação axial da hidroxila (OH) e em 1733 cm^{-1} o espectro do estiramento da ligação C=O da função ácido carboxílico. Na mistura pode-se observar as bandas características do lipídio tripalmitina e ácido oleico, como o estiramento da ligação C=O em 1733 cm^{-1} , o estiramento da ligação C-H do grupo alquila em 2914 cm^{-1} assim como uma deformação angular de C-O em 1173 cm^{-1} .

Nas Figuras 20 e 21 (A e B) observa-se no espectro das nanopartículas (NLS e CLN) a presença de praticamente as mesmas bandas característica do lipídio tripalmitina, como o estiramento da ligação C=O da função éster e o estiramento da ligação C-H do grupo alquila, indicando que não foram produzidas alterações na matriz lipídica durante o preparo das nanopartículas. Pode-se observar ainda que nas nanopartículas contendo os fármacos ocorreram deformações da região de 3340 cm^{-1} caracterizada pela presença do grupamento O-H na estrutura, proveniente na ivermectina, no entanto, este estiramento pode ser devido a água residual não removida durante o processo de secagem.

DO SANTOS (2014), em estudo de avaliação de sistemas lipídicos nanoestruturados (NLS e CLN) encapsulando praziquantel obteve resultados que demonstram a interação entre o praziquantel e a matriz lipídica de ambos sistemas carreadores. ALI *et al.* (2013), obteve em estudos espectros de infravermelho que demonstram a interação de ivermectina com nanopartículas de quitosana-alginato.

4.1.7 Eficiência de encapsulação

A porcentagem dos ativos encapsulados foi determinada através da quantificação da porcentagem dos ativos IVM e MTP não encapsulados, livres no sobrenadante após a ultrafiltração, usando-se a equação 1. A porcentagem de encapsulação está apresentada na tabela 4.

Inúmeros são os fatores que podem influir na taxa de encapsulação dos ativos em sistemas nanoestruturados, entre os principais temos: as características físico-químicas do ativo (solubilidade), o tipo de tensoativo, características do lipídio, pH do meio e a quantidade de ativo utilizada (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; MEHNERT; MÄDER, 2001).

Tabela 4 – Porcentagem de encapsulação dos ativos IVM e MTP.

Formulação	NLS + IVM	NLS + MTP	CLN + IVM	CLN + MTP
% EE	99,90 ± 0,02	99,85 ± 0,02	99,90 ± 0,02	99,84 ± 0,02

DE SOUZA (2011), utilizando NLS no encapsulamento de praziquantel obteve uma eficiência de encapsulação de 99,06 % ± 0,30 %. LIU *et al.* (2005), utilizando microesfera de zeína obteve na encapsulação de ivermectina uma eficiência de encapsulação de cerca de 60 %. ALI *et al.* (2013), utilizando nanopartículas de quitosana/alginato para encapsular IVM, obteve uma eficiência de 75,67 %. Desta forma, observa-se que as NLS e os CLN podem ser indicados como os carreadores com melhores eficiência de encapsulação.

4.1.8 Ensaio de liberação dos ativos

A liberação dos ativos está diretamente relacionada com a estrutura dos carreadores, bem como a interação do ativo com o sistema carreador. Basicamente as nanopartículas lipídicas sólidas são compostas por um núcleo sólido coberto por uma camada de moléculas de agente tensoativo (MARCATO, 2009). A estrutura das partículas é dependente do método de preparo utilizado e das concentrações dos componentes da partícula (SOUTO; MÜLLER, 2008). Os resultados se encontram na Figura 22 e 23.

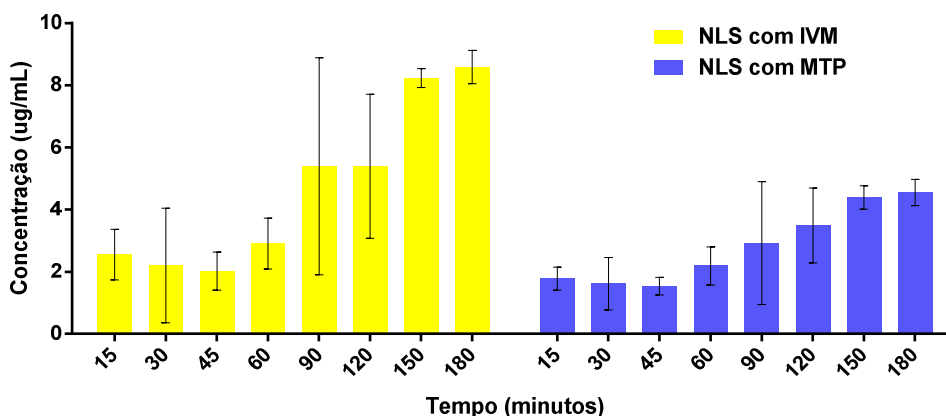
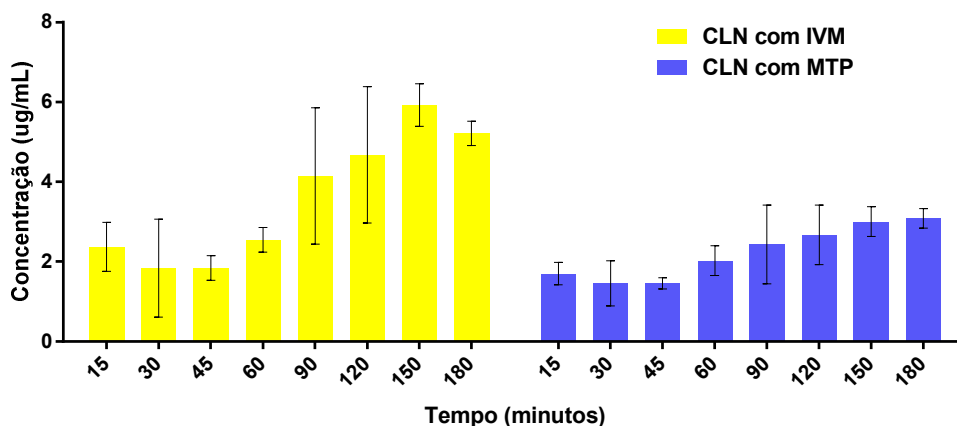
Figura 22 – Ensaio de liberação *in vitro* dos ativos IVM e MTP das partículas de NLS em função do tempo de 180 minutos.

Figura 23 – Ensaio de liberação *in vitro* dos ativos IVM e MTP das partículas de CLN em função do tempo de 180 minutos.



Como observado nas Figuras 22 e 23, as formulações de NLS e CLN contendo os fármacos apresentam uma liberação lenta. Comparando as formulações em teste, tanto nas NLS como nos CLN, a IVM é liberada mais rapidamente que o MTP. Este fato provavelmente é devido às interações intermoleculares existentes entre os ativos e os componentes dos sistemas carreadores, o que também pode explicar o fato de que a liberação dos ativos ocorre de forma lenta.

O processo de liberação de um ativo pode sofrer influência de diversos fatores, como o tipo de ativo, solubilidade, tamanho das partículas, polimorfismo do ativo, entre outros fatores. Afim de obter maiores informações sobre a liberação, utilizou-se o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas (Equação 2), chamado também de Lei de Potência, para elucidar o tipo de mecanismo com que os fármacos são liberados das nanopartículas lipídicas (SOPPIMATH, 2001; COLOMBO *et al.*, 2005).

$$M_t/M_{\infty} = kt^n \quad (2)$$

,onde M_t é a quantidade de ativo liberado em um determinado tempo t , M_{∞} é a quantidade de herbicida liberada num tempo infinito, representando a liberação fracional do ativo, k é a constante cinética de liberação e n é o expoente de liberação. O valor de n é utilizado para caracterizar o tipo do mecanismo de

liberação. Para processo de difusão fickiniana, o valor de n é 0,5. Quando o valor de n é 1,0, o mecanismo de liberação corresponde a um modelo não-fickiniano do tipo Caso II. Para valores de n entre 0,5 e 1,0, o modelo de liberação do ativo é classificado como não-fickiniano do tipo transporte anômalo (KORSMEYER *et al.*, 1983; PEPPAS, 1985; PEPPAS; SAHLIN, 1989; KORSMEYER; PEPPAS, 1991; SIEPMANN; PEPPAS, 2001).

A partir das curvas de liberação foram feitas as regressões lineares para determinação dos coeficientes de correlação (r) e constante de liberação (k). Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 24 e na Tabela 5.

Figura 24 – Resultados obtidos com o modelo Korsmeyer-Peppas: A) NLS com IVM, B) NLS com MTP, C) CLN com IVM e D) CLN com MTP.

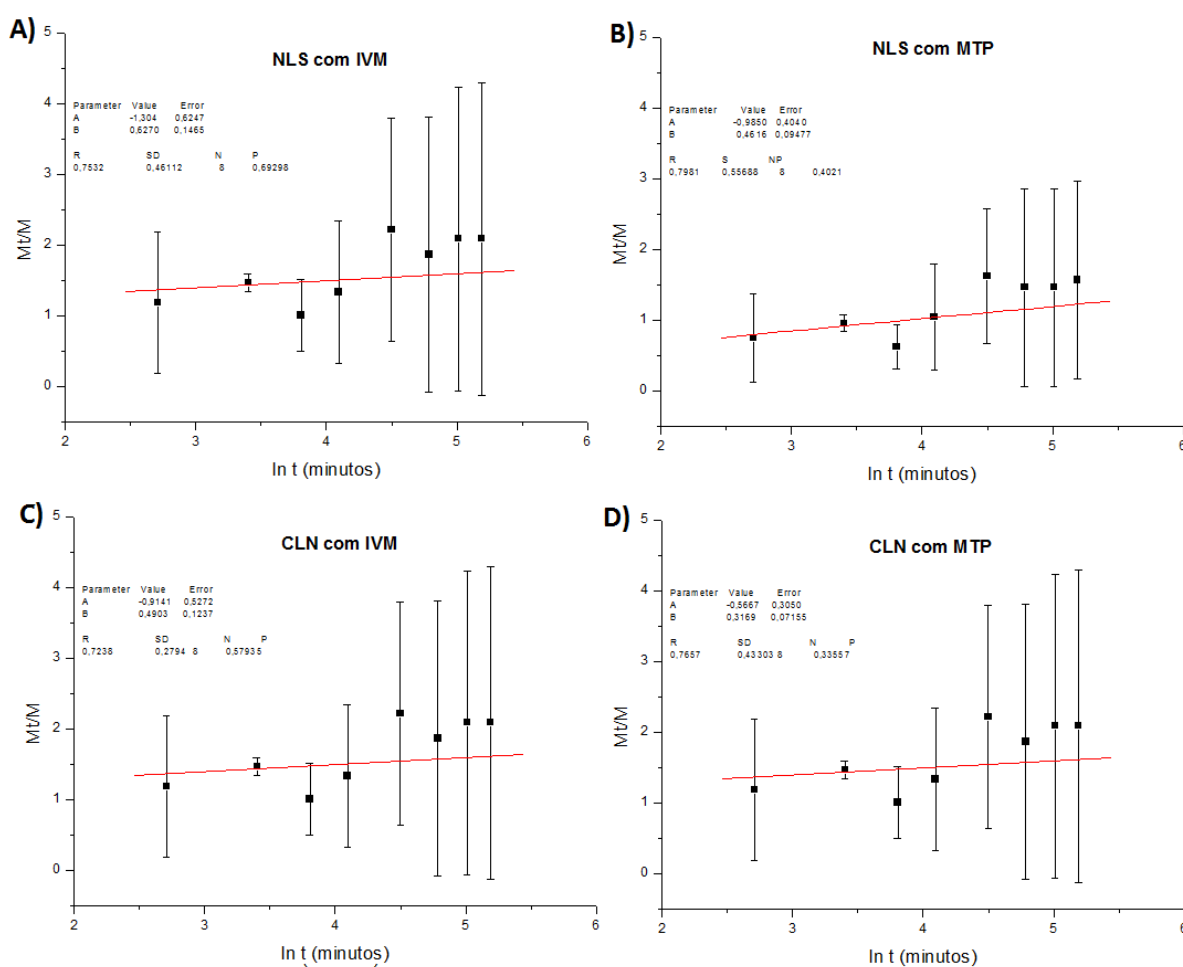


Tabela 5 –Valores de constantes de liberação (k), expoente de liberação (n) e coeficiente de correlação (r) obtidos das curvas das cinéticas de liberação dos fármacos associados às nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados.

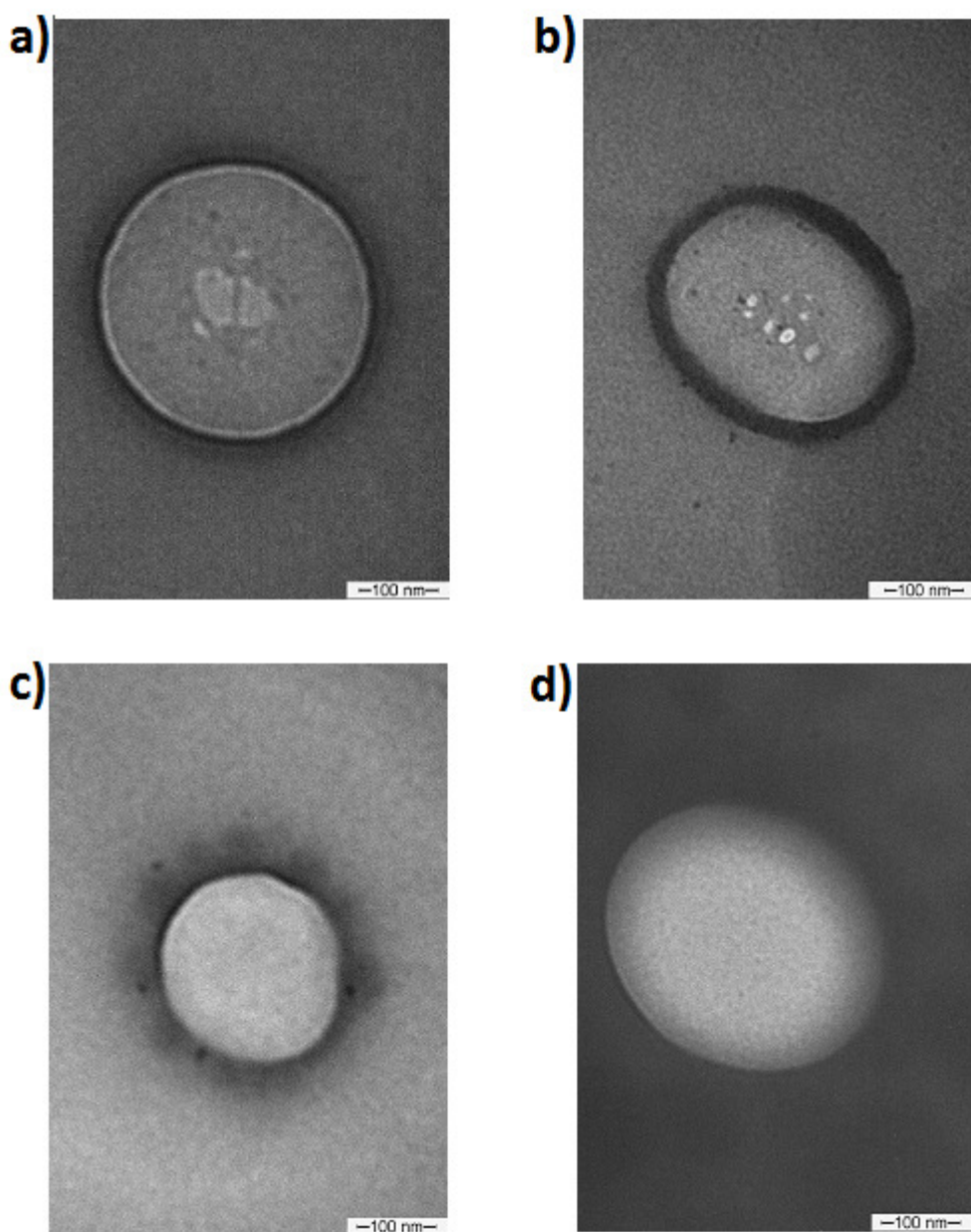
Formulação	Constante de liberação (k)	Expoente de libeeração (n)	Coeficiente de correlação (r)
NLS + IVM	0,27 min ⁻¹	0,63	0,7532
NLS + MTP	0,37 min ⁻¹	0,46	0,7981
CLN + IVM	0,40 min ⁻¹	0,49	0,7238
CLN + MTP	0,56 min ⁻¹	0,32	0,7657

Como se observa na Tabela 5, a linearização pela equação de Korsmeyer-Peppas não originou dados com uma correlação satisfatória, levando a conclusão que para NLS contendo IVM, o tipo do mecanismo de liberação é classificado como processo de difusão fickiniana, já para as outras três formulações, o processo de liberação é classificado como nao-fickiniano do tipo transporte anômalo.

4.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

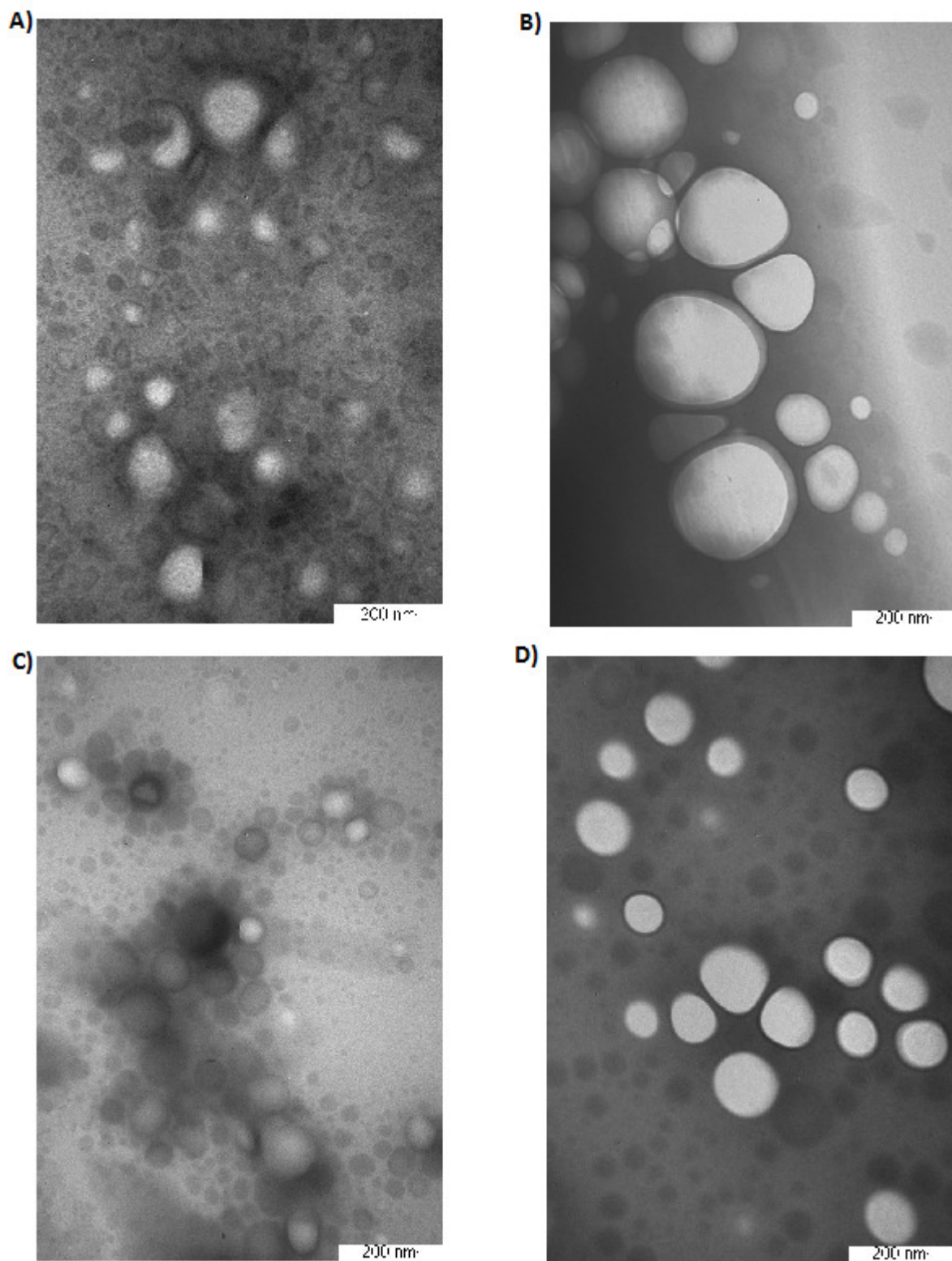
A técnica de MET foi empregado para caracterizar a morfologia das nanopartículas NLS e CLN contendo os ativos IVM e MTP, sendo avaliadas no tempo inicial de estocagem (Figura 25).

Figura 25 – Micrografias de NLS no tempo de 0 dias contendo IVM (a) e MTP (b), e CLN no tempo de 0 dias contendo os ativos IVM (c) e MTP (d) com aumento de 100.000 vezes.



Como esperado, pode-se observar nas micrografias obtidas que todas as nanopartículas apresentam formato esférico.

Figura 26 – Micrografias de NLS no tempo de 0 dias contendo IVM (a) e MTP (b), e CLN no tempo de 0 dias contendo os ativos IVM (c) e MTP (d) com aumento de 60.000 vezes.



A Figura 25 apresenta a micrografia de NLS no tempo de 0 dias contendo IVM (a) e MTP (b), e CLN no tempo de 0 dias contendo os ativos IVM (c) e MTP (d) com aumento de 27800 vezes. Assim como na Figura 26, pode-se observar que as nanopartículas (NLS e CLN) apresentam aproximadamente o mesmo tamanho e formato esférico, não havendo formação de uma segunda população, não ocorrendo alteração das características morfológicas das nanopartículas.

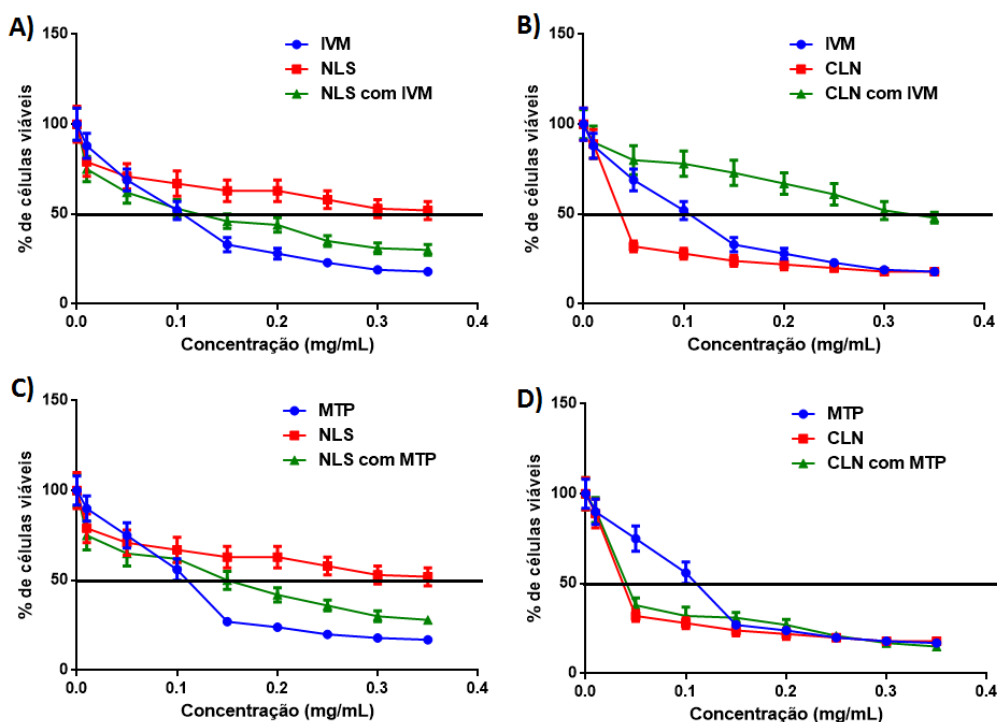
4.3 Ensaios de cito e genotoxicidade

4.3.1 Ensaio de citotoxicidade - Teste de redução do tetrazolium MTT (método colorimétrico)

Foram utilizadas dois tipos celulares para verificar possíveis variações entre diferentes células, sendo utilizadas células do tipo 3T3 e células V79.

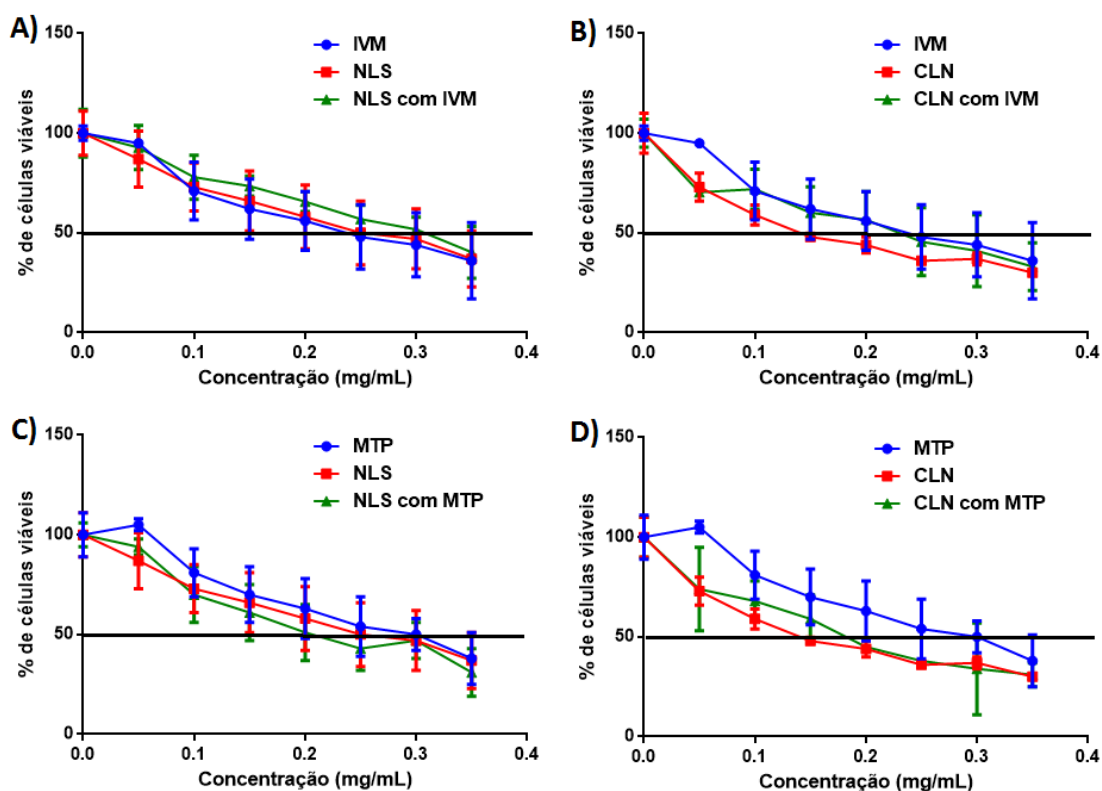
A Figura 27 apresenta os resultados para os ensaios de viabilidade celular, onde foram avaliados os efeitos citotóxicos dos fármacos IVM e MTP, das NLS e CLN contendo os fármacos IVM e MTP, e também das NLS e CLN na ausência destes utilizando-se células 3T3.

Figura 27 – Avaliação da citotoxicidade de células 3T3 para IVM, NLS e NLS com IVM (a); IVM, CLN e CLN com Ivm (b); MTP, NLS e NLS com MTP (c); e MTP, CLN e CLN com MTP (d).



A Figura 28 apresenta os resultados para os ensaios de viabilidade celular, onde foram avaliados os efeitos citotóxicos dos fármacos IVM e MTP, das NLS e CLN contendo os fármacos IVM e MTP, e também das NLS e CLN na ausência destes utilizando-se células V79.

Figura 28 – Avaliação da citotoxicidade de células V79 para IVM, NLS e NLS com IVM (a); IVM, CLN e CLN com Ivm (b); MTP, NLS e NLS com MTP (c); e MTP, CLN e CLN com MTP (d).



A Tabela 6 apresenta os valores de IC_{50} para os ativos (IVM e MTP) e também para as formulações de NLS e CLN na ausência e contendo esses ativos para as células 3T3 e V79.

Tabela 6 – Valores de IC₅₀ para as formulações de NLS e CLN na ausência e contendo IVM e MTP, e de IVM e MTP para células 3T3 e V79.

Formulação	IC₅₀ (mg/mL) para 3T3	IC₅₀ (mg/mL) para V79
NLS	0,325	0,261
CLN	0,100	0,207
IVM	0,147	0,251
MTP	0,146	0,281
NLS + IVM	0,174	0,295
NLS + MTP	0,181	0,238
CLN + IVM	0,325	0,234
CLN + MTP	0,115	0,208

Os resultados demonstram que as nanopartículas testadas para a encapsulação possibilitaram a alteração na viabilidade celular das células testadas. Porém, as nanopartículas sem a presença dos ativos apresentaram citotoxicidade na faixa de concentração estudada, uma vez que não mantiveram a viabilidade celular em torno de 100 % para as concentrações analisadas. Observa-se nas Figuras 27 (células 3T3) e 27 (células V79) que as NLS apresentam menor toxicidade que os CLN, onde o valor de IC₅₀ de NLS é maior que o de CLN. Quando ocorre a encapsulação, este fato se mantém, onde as formulações de NLS encapsulada com os ativos IVM ou MTP apresentam menor citotoxicidade que CLN encapsulado com os ativos IVM ou MTP, possibilitando uma melhora na viabilidade celular. Os resultados demonstram que, de forma geral, as formulações de nanopartículas com ativos encapsulados, apresentam viabilidade celular acima de 50% quando testadas concentrações menores que 0,2 mg/mL.

Observa-se na tabela 6 que as células V79 apresentaram maiores valores de IC₅₀ quando comparadas com as células 3T3, exceto para as NLS e CLN contendo IVM. Desta forma, as formulações apresentaram menor toxicidade (maior valor de IC₅₀) para as células V79. Para as células V79, as formulações de NLS apresentam maiores valores de IC₅₀ que as formulações de CLN, ou seja, apresentam menor toxicidade. O mesmo pode ser observado para as células 3T3, exceto quando ocorre a encapsulação de IVM, ocorrendo a inversão, ou seja, o CLN contendo IVM

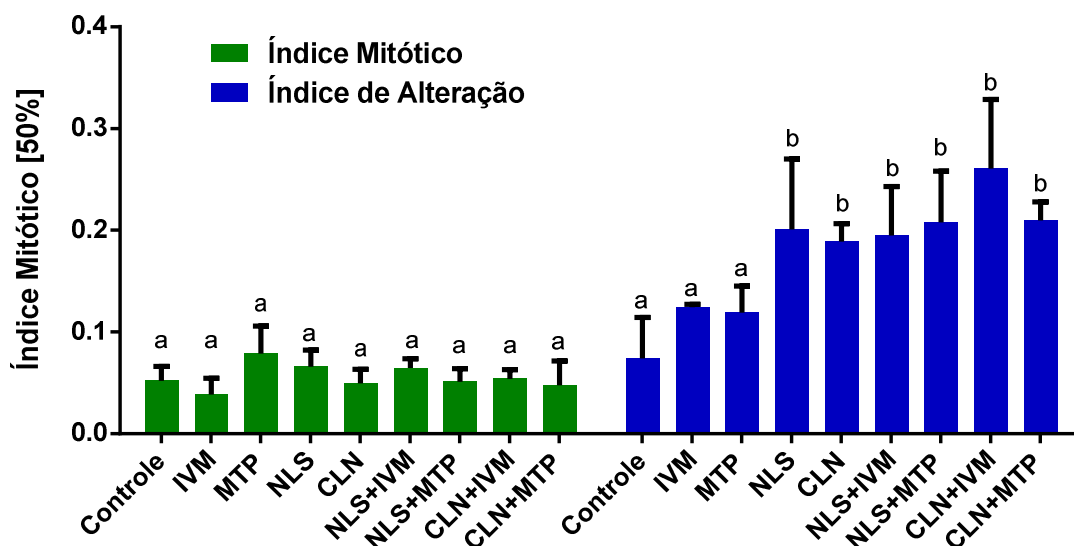
apresenta maior valor de IC₅₀ que a NLS contendo IVM. O fato das formulações de NLS apresentarem maiores valores de IC₅₀ (menor toxicidade) quando comparadas com as formulações de CLN, pode estar relacionada com a composição das nanopartículas. Segundo SCHÖLER *et al.* (2002), a alteração do núcleo lipídico provoca significativa influência no valor de IC₅₀.

CAMPOS *et al.* (2015), em testes de NLS encapsuladas com fungicidas, utilizando três tipos de células (osteoblastos, adenocarcinoma e fibroblastos) obteve resultados que demonstraram que as nanopartículas foram menos tóxicas que os fungicidas comerciais.

4.3.2 Ensaio de genotoxicidade *Allium cepa*

A Figura 29 apresenta os resultados para os ensaios de índice mitótico obtidos com ensaio de aberração cromossômica *Allium cepa*, onde foram avaliados os efeitos genotóxicos dos fármacos IVM e MTP, das NLS e CLN contendo os fármacos IVM e MTP, e também das NLS e CLN na ausência destes.

Figura 29 – Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de células de *Allium cepa* para os fármacos IVM e MTP, carreadores NLS e CLN, e formulações de NLS com IVM; CLN com IVM, NLS com MTP e CLN com MTP. Utilizou-se o teste ANOVA para verificação de alterações significativas, sendo considerada uma significância de $p < 0,05$ para as diferenças estatísticas observadas entre os grupos, onde **a** representa variações não significativas entre as formulações em relação ao controle; **b** representa variações significativas formulações em relação ao controle.



Na Figura 29 estão representados os resultados dos testes de citotoxicidade dos fármacos IVM e MTP em *Allium cepa*, onde o índice mitótico representa o número de células em divisão em relação ao número total de células. O índice mitótico é usado como indicador de proliferação adequada das células (GADANO *et al.*, 2002), o que pode ser medido através do teste vegetal de *Allium cepa*.

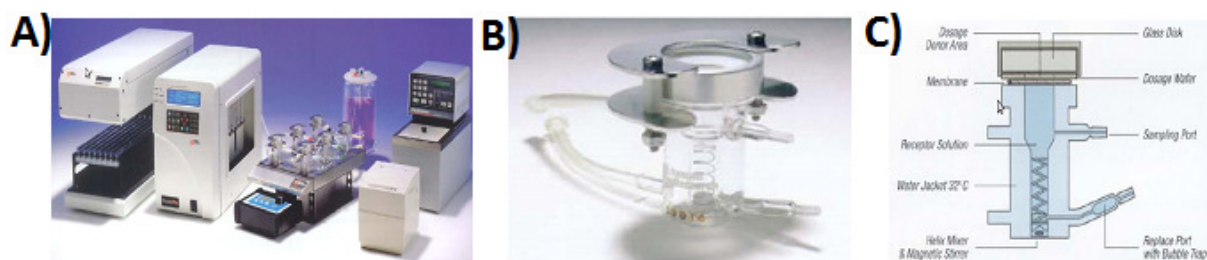
Com relação a genotoxicidade pode-se observar que as formulações provocaram alterações em relação à solução controle, onde a NLS apresenta maior índice mitótico que CLN, tanto na presença de IVM quanto na ausência dos fármacos. Tanto as NLS como os CLN apresentaram valores de índice mitótico acima do controle, o que indica que as formulações provocam um estímulo à divisão celular. O nível de citotoxicidade das amostras pode ser determinado pela taxa de diminuição do índice mitótico: a redução do índice mitótico para valores inferiores a 22% do valor do controle negativo causa efeitos letais nos organismos teste (ANTONISIEWICZ, *apud* SMAKA-KINCL *et al.*, 1996). O nível de 50% é chamado de valor limite de citotoxicidade (SMAKA-KINC *et al.*, 1996). Desta forma, as formulações testadas não apresentaram citotoxicidade nas concentrações em teste.

O índice de alteração é utilizado indicação de genotoxicidade através de verificação de possíveis danos ao DNA. Desta forma, pode-se observar na Figura 29 que todas as formulações testadas provocaram alterações no DNA das células testadas, onde o uso dos nanocarreadores NLS e CLN para encapsulação de IVM e MTP aumentaram o valor do índice de alteração destes dois ativos (IVM e MTP), aumentando as alterações no organismo testado.

4.4. Teste de Permeação em membranas modelos

As formulações foram testadas por 24 horas utilizando-se o Sistema Microette Plus Hanson com células de Franz de difusão vertical (Figura 30) e não possibilitaram a permeação dos fármacos através da membrana limitadora. Este fato pode ter ocorrido devido a baixa liberação dos fármacos que provavelmente se mantiveram nas NLS e CLN e a quantidade de fármaco encontrar-se abaixo do limite de quantificação do método analítico. Outro fator relevante é a baixa solubilidade dos ativos em água (4 µg/mL para IVM e 1,4 µg/mL para MTP). Desta forma, em meio aquoso, tanto a IVM como o MTP podem ser facilmente cristalizadas ou degradadas.

Figura 30 – Sistema Microette Plus Hanson: (a) Visão geral do sistema; (b) A célula de Franz; (c) Detalhes da célula de difusão vertical de Franz.



5 CONCLUSÕES

O presente trabalho forneceu conhecimento de dados importantes sobre o preparo, caracterização, avaliação de citotoxicidade e encapsulação de nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados contendo os fármacos ivermectina e metopreno, preparadas pelo método de emulsificação/evaporação de solvente.

Os resultados obtidos demonstram que as nanopartículas desenvolvidas (NLS e CLN) apresentam alta capacidade de encapsulação dos ativos IVM e MTP (acima de 99 %). As formulações desenvolvidas apresentaram estabilidade durante o tempo de estocagem. Por diferentes técnicas (ECF e NTA), foram obtidos valores semelhantes para a distribuição de tamanho, e também um perfil monomodal, ou seja, apenas uma população de partículas. Pode-se observar que durante o tempo de estocagem ocorreu variação na intensidade do tamanho da partícula analisada, o que pode indicar possível formação de agregados.

Pela técnica de ECF, as NLS apresentaram um diâmetro médio entre 275 nm a 295 nm, e os CLN, entre 245 nm e 260 nm; já o índice de polidispersão das formulações de NLS e CLN ficaram abaixo de 0,2. O potencial zeta médio das formulações de NLS e CLN variaram entre -14 mV e -25 mV.

Através da técnica de NTA também foi possível verificar a concentração de partículas de cada formulação. Foram obtidas para as formulações de NLS no tempo de 0 dias para as NLS na ausência dos ativos foi obtido um diâmetro hidrodinâmico de $203,7 \pm 65,5$ nm e uma concentração de $2,49 \pm 0,12 \times 10^{13}$ partículas por mL. Para as NLS contendo os ativos IVM e MTP, foram obtidos diâmetros médios de $237,3 \pm 83,6$ nm e $185,1 \pm 98,3$ nm, e concentração de $4,32 \pm 0,3 \times 10^{13}$ e $7,47 \pm 1,14 \times 10^{13}$ partículas por mL, respectivamente. Para os CLN na ausência dos ativos, o diâmetro médio apresentado foi de $191,1 \pm 52,2$ nm e concentração de $5,43 \pm 0,06 \times 10^{13}$ partículas por mL. Para os CLN com os ativos IVM e MTP o diâmetro médio apresentado foi de $196,5 \pm 87,1$ nm e $196,3 \pm 62,3$ nm, e a concentração foi de $4,35 \pm 0,3 \times 10^{13}$ e $4,53 \pm 0,09 \times 10^{13}$ partículas por mL, respectivamente.

Assim como ocorreu com a técnica de ECF, pode-se observar também pela técnica de NTA que as formulações de NLS apresentaram maior diâmetro hidrodinâmico médio quando comparadas às formulações de CLN. Isto pode se dar

pelo fato de que os CLN são formados por lipídios sólidos e líquidos, enquanto as NLS são formadas apenas por lipídio sólido.

As análises de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que tanto as NLS como os CLN apresentam morfologia esférica, sem a presença de agregados.

Os ensaios de cinética de liberação demonstraram que os perfis cinéticos dos ativos encapsulados nas NLS e CLN foram lentos. Comparando as formulações em teste, a IVM é liberada mais rapidamente que o MTP, fato este, provavelmente devido às interações intermoleculares existentes entre os ativos e os componentes do sistema carreador, o que também pode provocar maior liberação quando comparados os tipos de carreadores.

Os resultados do ensaio de cito e genotoxicidade demonstram que as nanopartículas testadas para a encapsulação possibilitaram a alteração na viabilidade celular das células testadas. Porém, as nanopartículas sem a presença dos ativos apresentaram citotoxicidade na faixa de concentração estudada, uma vez que não mantiveram a viabilidade celular em torno de 100 % para as concentrações analisadas. Observa-se que quando ocorre a encapsulação de IVM por NLS, ocorre uma melhora na viabilidade celular. Já na encapsulação da IVM por CLN, não ocorreu alterações no percentual de células viáveis. Os resultados também demonstraram que quando se realiza a encapsulação do MTP por NLS e CLN, ocorreu alterações no percentual de células viáveis quando comparado com a viabilidade celular de apenas o ativo. As NLS apresentaram maior viabilidade celular em comparação aos CLN.

Os testes de genotoxicidade demonstraram que todas as formulações testadas provocaram alterações no DNA das células testadas, onde o uso dos nanocarreadores NLS e CLN para encapsulação de IVM e MTP aumentaram o valor do índice de alteração destes dois ativos (IVM e MTP), aumentando as alterações no organismo testado.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que as NLS apresentaram melhores resultados em comparação aos CLN, apresentando maior liberação e melhor viabilidade celular. De modo geral, nanopartículas apresentaram boas características coloidais e a presença ou ausência de drogas não provocam alterações nas características das nanopartículas, possibilitando o desenvolvimento de sistemas carreadores para estes fármacos visando aplicações veterinárias.

6 REFERÊNCIAS

- ALI, M.; AFZAL, M.; VERMA, M.; MISRA-BHATTACHARYA, S.; AHMAD, F.J.; DINDA, A.K. Improved antifilarial activity of ivermectin in chitosan–alginate nanoparticles against human lymphatic filarial parasite, *Brugia malayi*. **Parasitology Research**, v.112, p.2933-2943, 2013.
- AMORENA, B.; BASELGA, R.; ALBIZU, I. Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. **Vaccine**, v.12, p.243–249, 1994.
- AMOS, T.; WILLIAMS, P. Insect growth regulators: some effects of methoprene and hydroprene on productivity of several stored grain insects. **Australian Journal of Zoology**, v.25, p.201–206, 1977.
- ANDERSON, W.; KOZAK, D.; COLEMAN, V.A.; JÄMTING, Å.K.; TRAU, M. A comparative study of submicron particle sizing platforms: Accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.405, p.322–330, 2013.
- ANDRADE, S. F.; RODRIGUES, A. S. Regras básicas para o uso de ivermectina na clínica de pequenos animais. **A Hora Veterinária**, v.21, n.125, p.53-57, 2002.
- ARANHA, I. B.; LUCAS, E. F.; Poli(Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo. **Polímeros**, v.11, n.4, p.174-181, 2001.
- ASRAR J, DING Y, LA MONICA R.E, NESS L.C. Controlled release of tebuconazole from a polymer matrix microparticle: Release kinetics and length of efficacy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4814-4820, 2004.
- ATKINS, P. W.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2012.
- BALL, B.A.; SABEUR, K.; ALLEN, W.R. Liposome-mediated uptake of exogenous DNA by equine spermatozoa and applications in sperm-mediated gene transfer. **Equine Veterinary Journal**, v.40, p.76–82, 2008.
- BARBOUR, E.K.; NEWMAN, J.A. Preliminary data on efficacy of *Mycoplasma gallisepticum* vaccines containing different adjuvants in laying hens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.26, p.115–123, 1990.
- BERNSTEEN, L.; GREGORY, C.R.; KYLES, A.E.; GRIFFEY, S.M.; PATZ, J. Microemulsified cyclosporine-based immunosuppression for the prevention of acute renal allograft rejection in unrelated dogs: Preliminary experimental study. **Veterinary Surgery**, v.32, p.213–219, 2003.
- BILL, R. **Pharmacology for veterinary technicians**. California: A&Chnicians, 1993.

BIONANOPLUS. **Bionanoplus**. Disponível em: <http://www.bionanoplus.com/veterinary-aquaculture-nano-vaccine.html>. Acesso em dezembro de 2015.

BIOSPACE. **BioSpace**. Disponível em: <http://www.biospace.com/News/isconova-concludes-partnership-with-virbac-s-a/267794>. Acesso em dezembro de 2015.

BONTEMPO, V.; BALDI, A.; CHELI, F.; FANTUZ, F.; POLITIS, I.; CARLI, S.; DELL'ORTO, V. Kinetic behavior of three preparations of alpha-tocopherol after oral administration to postpubertal heifers. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, p.589–593, 2000.

BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica veterinária**. 7. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992.

BOSCAN, P.; REZENDE, M.L.; GRIMSRUD, K.; STANLEY, S.D.; MAMA, K.R.; STEFFEY, E.P. Pharmacokinetic profile in relation to anaesthesia characteristics after a 5% micellar microemulsion of propofol in the horse. **British Journal of Anaesthesia**, v.104, p.330–337, 2010.

BOSCAN, P.; STEFFEY, E.P.; FARVER, T.B.; MAMA, K.R.; HUANG, N.J.; HARRIS, S.B. Comparison of high (5%) and low (1%) concentrations of micellar microemulsion propofol formulations with a standard (1%) lipid emulsion in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, p.1476–1483, 2006.

BOYD, R. D.; PICHAIMUTHU, S. K.; CUENAT, A. New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.387, n.1-3, p.35–42, 2011.

BRANDÃO, H.M.; GERN J.C.; VICENTINI, N.M.; PEREIRA, M.M.; ANDRADE, P.V.D. Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, ano XVII, v.53, p.61-67, 2011.

BUCHHOLZ, J.; KASER-HOTZ, B.; KHAN, T.; ROHRER BLEY, C.; MELZER, K.; SCHWENDENER, R.A.; ROOS, M.; WALT, H. Optimizing photodynamic therapy: In vivo pharmacokinetics of liposomal meta-(tetrahydroxyphenyl)chlorin in feline squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v.11, p.7538–7544, 2005.

BUCHHOLZ, J.; WERGIN, M.; WALT, H.; GRAFE, S.; BLEY, C.R.; KASER-HOTZ, B. Photodynamic therapy of feline cutaneous squamous cell carcinoma using a newly developed liposomal photosensitizer: Preliminary results concerning drug safety and efficacy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, p.770–775, 2007.

BUNKER, S.P.; WOOL, R.P. Synthesis and characterization of monomers and polymers for adhesives from methyl oleate., **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry** v.40, p.451-458, 2002.

CALDWELL, F.J.; MUELLER, P.O.; LYNN, R.C.; BUDSBERG, S.C. Effect of topical application of diclofenac liposomal suspension on experimentally induced

subcutaneous inflammation in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.65, p.271–276, 2004.

CAMPOS, E.V.R.; de OLIVEIRA, J.L.; SILVA, C.M.G.; PASCOLI, M.; PASQUOTO, T.; LIMA, R.; ABHILASH, P.C.; FRACETO, L.F. Polymeric and Solid Lipid Nanoparticles for Sustained Release of Carbendazim and Tebuconazole in Agricultural Applications. **Scientific Reports**, v.5, p.13809, 2015.

CAUCHARD, J.; TAOUJI, S.; SEVIN, C.; DUQUESNE, F.; BERNABE, M.; LAUGIER, C.; BALLEET, J.J. Immunogenicity of synthetic *Rhodococcus equi* virulence-associated protein peptides in neonate foals. **International Journal of Medical Microbiology**, v.296, p.389–396, 2006.

CHEN, C.; C.; TSAI, T.; H.; HUANG, Z.; R., FANG, Y. J. Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and pharmacokinetics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.74, p.474-482, 2010.

CLEALE, R.M.; MUIR, W.W.; WASELAU, A.C.; LEHMANN, M.W.; AMODIE, D.M.; LERCHE, P. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of propofol administered to cats in a novel, aqueous, nano-droplet formulation or as an oil-in-water macroemulsion. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.32, p.436–445, 2009.

COLOMBO, G.; PADERA, R.; LANGER, R.; KOHANE, D. S. Prolonged duration anesthesia with lipid-protein-sugar particles containing bupivacaine and dexamethasone. **Prolong. Duration Local Anesth.**, v. 75, p. 458-464, 2005.

CONFALONIERI, E.O.; SORACI, A.L.; BECALUBA, M.; DENZOIN, L.; RODRIGUEZ, E.; RICCIO, B.; TAPIA, O. The disposition of free and niosomally encapsulated Racflurbiprofen in dairy bovines. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.33, p.9–14, 2010.

COSTA JR., E. S.; MANSUR, H. S.; Preparação e Caracterização de Blendas de Quitosana/Poli(Álcool Vinílico) Reticuladas Quimicamente com Glutaraldeído para Aplicação em Engenharia de Tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p.1460-1466, 2008.

CUBILLOS, C.; de la TORRE, B.G.; JAKAB, A.; CLEMENTI, G.; BORRAS, E.; BARCENA, J.; ANDREU, D.; SOBRINO, F.; BLANCO, E. Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide. **Journal of Virology**, v.82, p.7223–7230, 2008.

DAGLISH, G. J.; HOLLOWAY, J. C.; NAYAK, M. K. Implications of methoprene resistance for managing *Rhyzopertha dominica* (F.) in stored grain. **Journal of Stored Products Research**, v.54, p.8-12, 2013.

DE LIMA, R.; FEITOSA, L.; GRILLO, R.; PEREIRA, A.E.S.; FRACETO, L.F. Evaluation of the genotoxicity of polymeric microparticles containing ametryn

herbicide. **Journal of Environmental Science & Engineering: A**, v.1(4), p.553-565, 2012.

DE LIMA, R.; FEITOSA, L.; PEREIRA, A.E.S.; DE MOURA, M.R.; AOUADA, F.A.; MATOSSO, L.H.C.; Fraceto L.F. Evaluation of the genotoxicity of chitosan nanoparticles for use in food packaging films. **Journal of Food Science**, v.75, n.6, p.N89-N96, 2010.

DE SOUZA, A.L.R. Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas contendo praziquantel [tese]. Araraquara (SP): Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.

DOS SANTOS, F.K. Avaliação de sistemas lipídicos nanoestruturados utilizando como estratégia para melhorar as propriedades biofarmacêuticas do praziquantel no tratamento da esquistossomose [tese]. Araraquara (SP): Programa de Pós Graduação Interinstitucional em Nanotecnologia Farmacêutica, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2014.

DHADIALLA, T.S.; CARLSON, G.R.; LE, D.P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.545–569, 1998.

DINIZ, D.G.A. **Obtenção, caracterização e avaliação da citotoxicidade sobre neoplásicas da isotretinoína encapsulada em lipossomas e nanocápsulas poliméricas**. 177 f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

DOW, S.; ELMSLIE, R.; KURZMAN, I.; MACEWEN, G.; PERICLE, F.; LIGGITT, D. Phase I study of liposome-DNA complexes encoding the interleukin-2 gene in dogs with osteosarcoma lung metastases. **Human Gene Therapy**, v.16, p.937–946, 2005.

EGUCHI, E.S.; CECATO, U.; SILVA, S.L. O caminho da nanotecnologia na produção animal brasileira. **PUBVET**, Londrina, v. 7, n. 8, Ed. 231, Art. 1528, 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **I Simpósio Internacional sobre Controle de Carrapatos e Doenças Transmitidas**, Campo Grande, 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio**, São Carlos, 2013.

FANG, J.Y.; FANG, C.L.; LIU, C.H.; SU, Y.H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.70, p.633-640, 2008.

FILIFE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v.27, n.5, p.796–810, 2010.

FLORINDO, H.F.; PANDIT, S.; GONÇALVES, L.M.; VIDEIRA, M.; ALPAR, O.; ALMEIDA, A.J. Antibody and cytokine-associated immune responses to *S. equi* antigens entrapped in PLA nanospheres. **Biomaterials**, v.30, p.5161–5169, 2009.

FOX, L.E.; MACEWEN, E.G.; KURZMAN, I.D.; DUBIELZIG, R.R.; HELFAND, S.C.; VAIL, D.M.; KISSEBERTH, W.; LONDON, C.; MADEWELL, B.R.; RODRIGUEZ Jr., C.O. Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine for the treatment of feline mammary adenocarcinoma – A multicenter randomized double-blind study. **Cancer Biotherapy**, v.10, p.125–130, 1995.

FRICKER, G.; KROMP, T.; WENDEL, A.; BLUME, A.; ZIRKEL, J.; REBMANN, H.; SETZER, C.; QUINKERT, R. O.; MARTIN, F.; MÜLLER-GOYMAN, C. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v.27, p.1469-1486, 2010.

FUKUTOME, K.; WATARAI, S.; MUKAMOTO, M.; KODAMA, H. Intestinal mucosal immune response in chickens following intraocular immunization with liposome-associated *Salmonella enterica* serovar enteritidis antigen. **Developmental and Comparative Immunology**, v.25, p.475–484, 2001.

GADANO, A.; GURNI, A.; LÓPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethonopharmacology**, v.8, p.11-16, 2002.

GAMISANS, F.; LACOUOLONCHE, F.; CHAUVET, A.; ESPINA, M.; GARCIA, M. L.; EGEA, M. A. Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v.179, p.37–48, 1999.

GAO, J.; GU, H.; XU, B. Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, synthesis, and biomedical applications. **Accounts of Chemical Research**, v.42, n.8, p.1097-1107, 2009.

GASCO, M. R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow distribution. **United States Patent and Trademark Office n. 5250236**, 1993.

GILLESPIE, C.; HALLING, P.; EDWARDS, D. Monitoring of particle growth at a low concentration of a poorly water soluble drug using the NanoSight LM20. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.384, n.1-3, p.233–239. doi: 10.1016/j.colsurfa.2011.03.052, 2011.

GONZALEZ-MIRA, E.; EGEA, M.A.; CALPENA, A.C.; GARCIA, M.L. Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. **Nanotechnology**, v.22, p.45101, 2011.

GOVENDER, T.; RILEY, T.; EHTEZAZI, T.; GARNETT, M. C.; STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. Defining the drug incorporation properties of PLA–PEG Nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.199, p.95–110, 2000.

GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNETT, M. C.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release**, v.57, p.171–185, 1999.

GREENWOOD, D.L.; DYNON, K.; KALKANIDIS, M.; XIANG, S.; PLEBANSKI, M.; SCHEERLINCK, J.P. Vaccination against foot-and-mouth disease virus using peptides conjugated to nano-beads. **Vaccine**, v.26, p.2706–2713, 2008.

GREENWOOD, R. Review of the measurement of zeta potentials in concentrated aqueous suspensions using electroacoustics. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.106, p.55-81, 2003.

GRILLO, R; SANTOS, P. Z. N.; MARUYAMA, R. C.; ROSA, H. A.; DE LIMA, R.; FRACETO, F. L. Poly(-caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials (Print)**, v.231-232, p.1-9, 2012.

GUTERRES, S.S.; POLETO, F.S.; COLOMÉ, L.M.; RAFFI, R.P.; POHLMANN, A.R. **Polymeric Nanocapsules for Drug Delivery An Overview**, 2010.

HAFEMAN, S.; LONDON, C.; ELMSLIE, R.; DOW, S. Evaluation of liposomal clodronate for treatment of malignant histiocytosis in dogs. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v.59, p.441–452, 2009.

HAUCK, M.L.; LARUE, S.M.; PETROS, W.P.; POULSON, J.M.; YU, D.; SPASOJEVIC, I.; PRUITT, A.F.; KLEIN, A.; CASE, B.; THRALL, D.E.; NEEDHAM, D.; DEWHIRST, M.W. Phase I trial of doxorubicin-containing low temperature sensitive liposomes in spontaneous canine tumors. **Clinical Cancer Research**, v.12, p.4004–4010, 2006.

HECKERT, R.A.; ELANKUMARAN, S.; OSHOP, G.L.; VAKHARIA, V.N. A novel transcutaneous plasmid-dimethylsulfoxide delivery technique for avian nucleic acid immunization. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.89, p.67–81, 2002.

HENRICK, C. A. Methoprene. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.23, p.225-239, 2007.

HISZCZYNSKA-SAWICKA, E.; OLEZKA, G.; HOLEC-GASIOR, L.; LI, H.; XU, J.B.; SEDCOLE, R.; KUR, J.; BICKERSTAFFE, R.; STANKIEWICZ, M. Evaluation of immune responses in sheep induced by DNA immunization with genes encoding GRA1, GRA4, GRA6 and GRA7 antigens of *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v.177, p.281–289, 2011.

HU, F.Q.; ZHANG, Y.; DU, Y.-Z.; YUAN, H. Nimodipine loaded lipid nanospheres prepared by solvent diffusion method in a drug saturated aqueous system. **International Journal of Pharmaceutics**, v.348, p.146-152, 2008.

HUTTINGER, C.; HIRSCHBERGER, J.; JAHNKE, A.; KOSTLIN, R.; BRILL, T.; PLANK, C.; KUCHENHOFF, H.; KRIEGER, S.; SCHILLINGER, U. Neoadjuvant gene

delivery of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using magnetofection for the treatment of feline fibrosarcomas: A phase I trial. **The Journal of Gene Medicine**, v.10, p.655–667, 2008.

JAHNKE, A.; HIRSCHBERGER, J.; FISCHER, C.; BRILL, T.; KOSTLIN, R.; PLANK, C.; KUCHENHOFF, H.; KRIEGER, S.; KAMENICA, K.; SCHILLINGER, U. Intra-tumoral gene delivery of feline-2, feline-gamma and feline-CSF using magnetofection as a neoadjuvant treatment option for feline fibrosarcomas: A phase-I study. **Journal of Veterinary Medicine**. Series A – Physiology, Pathology, Clinical Medicine, v.54, p.599–606, 2007.

JANTHARAPRAPAP, R.; STAGNI, G. Effects of penetration enhancers on in vitro permeability of meloxicam gels. **International Journal of Pharmaceutics**. v.343, p.26-33, 2007.

JORES, K.; MEHNERT, W.; DRECHSLER, M.; et al. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 2, p. 217–227, 2004.

JOSHI, M.D.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.71, p.161-172, 2009.

KAMSTOCK, D.; GUTH, A.; ELMSLIE, R.; KURZMAN, I.; LIGGITT, D.; CORO, L.; FAIRMAN, J.; DOW, S. Liposome-DNA complexes infused intravenously inhibit tumor angiogenesis and elicit antitumor activity in dogs with soft tissue sarcoma. **Cancer Gene Therapy**, v.13, p.306–317, 2006.

KERX. **KERx Special Needs Nutrition**. Disponível em: <http://www.kerx.com/products/Nano-E/>. Acesso em dezembro de 2015.

KHANNA, C.; ANDERSON, P.M.; HASZ, D.E.; KATSANIS, E.; NEVILLE, M.; KLAUSNER, J.S. Interleukin-2 liposome inhalation therapy is safe and effective for dogs with spontaneous pulmonary metastases. **Cancer**, v.79, p.1409–1421, 1997.

KILIC, A. C.; CAPAN, Y.; VURAL, I.; GURSOY, R. N.; DALKARA, T.; CUINE, A.; HINCAL, A. A. Preparation and characterization of PLGA nanospheres for the targeted delivery of NR2B-specific antisense oligonucleotides to the NMDA receptors in the brain. **Journal of Microencapsulation**, v.22, p.633–641, 2005.

KLEI, T.R.; TORBERT, B.J.; CHAPMAN, M.R.; TURK, M.A. Efficacy of ivermectin in injectable and oral paste formulations against eight-week-old *Strongylus vulgaris* larvae in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, p.183–185, 1984.

KRAWIEC, D.R.; MCKIERNAN, B.C.; TWARDOCK, A.R.; SWENSON, C.E.; ITKIN, R.J.; JOHNSON, L.R.; KUROWSKY, L.K.; MARKS, C.A. Use of an amphotericin B lipid complex for treatment of blastomycosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.209, p.2073–2075, 1996.

KRISTL, J.; VOLK, B.; AHLIN, P.; GOMBAČ, K.; ŠENTJURČ, M. Interactions of solid lipid nanoparticles with model membranes and leukocytes studied by EPR. **International Journal of Pharmaceutics**, v.256, p.133–140, 2003.

KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. **Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems**. In: Roseman TJ, Mansdorf SZ (Eds.). Controlled release delivery systems. New York, USA: Marcel Dekker Inc, 1991.

KORSMEYER, R.W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.15, p. 25-35, 1983.

KUMAR, V. V.; CHANDRASEKAR, D.; RAMAKRISHNA, S.; KISHAN, V.; RAO, Y. M.; DIWAN, P. V. Development and evaluation of nitrendipine loaded solid lipid nanoparticles: Influence of wax and glyceride lipids on plasma pharmacokinetics. **International Journal of Pharmaceutics**, v.335, p.167-175, 2007.

LATHI, P.S.; MATTIASSON, B. Green Approach for the Preparation of biodegradable lubricant base stock from epoxidised vegetable oil. **Applied Catalysis B: Environmental**, v.69, p.207-212, 2007.

LEVINE, D.G.; EPSTEIN, K.L.; NEELIS, D.A.; ROSS, M.W. Effect of topical application of 1% diclofenac sodium liposomal cream on inflammation in healthy horses undergoing intravenous regional limb perfusion with amikacin sulfate. **American Journal of Veterinary Research**, v.70, p.1323–1325, 2009.

LI, W.; WATARAI, S.; IWASAKI, T.; KODAMA, H. Suppression of Salmonella enterica serovar Enteritidis excretion by intraocular vaccination with fimbriae proteins incorporated in liposomes. **Developmental and Comparative Immunology**, v.28, p.29–38, 2004.

LI, Z.; WANG, Y.; SHEN, J.; LIU, W.; SUN, X. The measurement system of nanoparticle size distribution from dynamic light scattering data. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 56, p. 94–98, 2014.

LIN, X.; LI, X.; ZHENG, L.; YU, L.; ZHANG, Q.; LIU, W. Preparation and characterization of monopalmitate nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.311, p.106-111, 2007.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R.H.; MÄDER, K. Liquid and semisolid SLN™ dispersions for topical application: rheological characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, p.561-567, 2004.

LIU, X.; SUN, Q.; WANG, H.; ZHANG, L.; WANG, J-Y. Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system. **Biomaterials**, v.26, p.109-115, 2005.

LYNN, R.C.; HEPLER, D.I.; KELCH, W.J.; BERTONE, J.J.; SMITH, B.L.; VATISTAS, N.J. Double-blinded placebo-controlled clinical field trial to evaluate the safety and

efficacy of topically applied 1% diclofenac liposomal cream for the relief of lameness in horses. **Veterinary Therapeutics**, v.5, p.128–138, 2004.

MACEWEN, E.G.; KURZMAN, I.D.; VAIL, D.M.; DUBIELZIG, R.R.; EVERLITH, K.; MADEWELL, B.R.; RODRIGUEZ Jr., C.O.; PHILLIPS, B.; ZWAHLEN, C.H.; OBRADOVICH, J.; ROSENTHAL, R.C.; FOX, L.E.; ROSENBERG, M.; HENRY, C.; FIDEL, J. Adjuvant therapy for melanoma in dogs: Results of randomized clinical trials using surgery, liposomeencapsulated muramyl tripeptide, and granulocyte macrophage colonystimulating factor. **Clinical Cancer Research**, v.5, p.4249-4258, 1999.

MACLEOD, D.L.; PRESCOTT, J.F. The use of liposomally-entrapped gentamicin in the treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Canadian Journal of Veterinary Research** – Revue Canadienne De Recherche Vétérinaire, v.52, p.445-450, 1988.

MADUREIRA, E.H. Entrevista sobre desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas para uso veterinário, incluindo emprego de micro e nanopartículas. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Ano XVII, v.53, p.5-8. 2011.

MANDAWGADE, S.D., SHOBHONA, S., PATHAK S., PATRAVALE, V.B. Development of SMEDDS using natural lipophile: Application to Artemether delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.362, p.179–183, 2008.

MANJUNATH, K.; REDDY, J. S.; VENKATESWARLU, V. Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v.27(2), p.1-20, 2005.

MANUJA, A.; KUMAR, B.; SINGH, R.K. Nanotechnology developments: opportunities for animal health and production. **Nanotechnology Development**, v.2, n.1, p.17-25, 2012.

MARCATO, P.D. Preparation, characterization and application in drugs and cosmetics of solid lipid nanoparticles. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.6(2), p.1-37, 2009.

MARIN, E.; BRICENO, M.I.; CABALLERO-GEORGE, C. Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. **International Journal of Nanomedicine**, v.8, p.3071–91, 2013.

MARQUES, C.; CARVALHEIRO, M.; PEREIRA, M.A.; JORGE, J.; CRUZ, M.E.; SANTOS-GOMES, G.M. Efficacy of the liposome trifluralin in the treatment of experimental canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v.178, p.133–137, 2008.

MARTINELLI, A.; MATIC, A.; JACOBSSON, P.; BÖRJESSON, L.; NAVARRA, A.M.; FERNICOLA A.; PANERO, S.; SCROSATI, B.; Structural analysis of PVA-based proton conducting membranes. **Solid State Ionics**, v.177, p.2431-2435, 2006.

MARTINEZ-FERNANDEZ, A.R.; NOGAL-RUIZ, J.J.; LOPEZ-ABAN, J.; RAMAJO, V.; OLEAGA, A.; MANGA-GONZALEZ, Y.; HILLYER, G.V.; MURO, A. Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. **Veterinary Parasitology**, v.126, p.287-298, 2004.

McCALL, J. W.; LINDEMANN, B. A.; PORTER, C. A. Evaluation of ivermectin and milbemycin oxime efficacy against *Dirofilaria immitis* infections of three and four months' duration in dogs. **American journal of veterinary research**, v.57, n.8, p.1189-1196, 1996.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.47, p.165–96, 2001.

MELLA, M.R.; MENDO, O.H. Nanotechnology on animal production. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.12, p.423-429, 2010.

MELO, M. M.; MARQUES, A. P.; VIANA, F. A. B. Avaliação das enzimas alanina-aminotransferase, aspartato-aminotransferase, fosfatase alcalina e creatinina-fosfoquinase em cães submetidos à administração semanal de ivermectina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, n.6, p.753-761, 1995.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.5, p.561-573, 2006.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais**. São Paulo: Varela, 1998, 150p.

MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRAT, G. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.89, p.614–626, 2000.

MUELLER, R.S.; VEIR, J.; FIESELER, K.V.; DOW, S.W. Use of immunostimulatory liposome-nucleic acid complexes in allergen-specific immunotherapy of dogs with refractory atopic dermatitis – A pilot study. **Veterinary Dermatology**, v.16, p.61–68, 2005.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. **Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology**, v.10, p.43-56, 2004.

MÜLLER, R. H.; RUNGE, S. A.; RAVELLI, V.; THÜNEMANN, A. F.; MEHNERT, W.; SOUTO, E. B. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN®): Drug lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.68, n.3, p.535-544, 2008.

MÜLLER, R.H.; LUCKS, J.S. Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen feste Lipid Nanosphären (SLN). **European Patent n. 0605497**, Germany, 1996.

MÜLLER, R.H.; MAËDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v.50, n.1, p.161-177, 2000.

NANOCOMPOSIX. NanoComposix's guide to dynamic light scattering measurement and analysis. **Guidelines for Dynamic Light Scattering Measurement and Analysis**, v.1.4, p.1-8, 2015.

New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. **Journal of Drug Delivery**, v. 2012, p.10, 2012.

NICOLETTI, P.; LENK, R.P.; POPESCU, M.C.; SWENSON, C.E. Efficacy of various treatment regimens, using liposomal streptomycin in cows with brucellosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, p.1004–1007, 1989.

OLBRICH, C.; KAYSER, O.; MÜLLER, R.H. Lipase degradation of Dynasan114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN) - effect of surfactants, storage time and crystallinity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.237(1-2), p.119-128, 2002.

OLIVA, G.; GRADONI, L.; CIARAMELLA, P.; DE LUNA, R.; CORTESE, L.; ORSINI, S.; DAVIDSON, R.N.; PERSECHINO, A. Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.36, p.1013–1019, 1995.

OLIVEIRA, J.L.; CAMPOS, E.V.R.; SILVA, C.M.G.; PASQUOTO, T.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. Solid Lipid Nanoparticles Co-loaded with Simazine and Atrazine: Preparation, Characterization, and Evaluation of Herbicidal Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63 (2), p.422-432, 2015.

ONUMA, M.; YASUTOMI, Y.; YAMAMOTO, M.; WATARAI, S.; YASUDA, T.; KAWAKAMI, Y. Antitumor effect of adriamycin entrapped in liposomes conjugated with antiovine tumor antigen monoclonal antibody in leukemic cows. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**. Reihe B, v.36, p.139–147, 1989.

PAAVOLA, A.; YLIRUUSI, J.; KAJIMOTO, Y.; KALSO, E.; WAHLSTRÖM, T.; ROSENBERG, P. Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. **Pharmaceutical Research**, v.12, p.1997–2002, 1995.

PAQUES, W. F., MACEDO, A. G. Lipases de Látex vegetais: Propriedades e Aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PARDEIKE, J., HOMMOSS, A., MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v.366, p. 170-184, 2009.

PAUL-MURPHY, J.R.; KRUGNER-HIGBY, L.A.; TOURDOT, R.L.; SLADKY, K.K.; KLAUER, J.M.; KEULER, N.S.; BROWN, C.S.; HEATH, T.D. Evaluation of liposome-encapsulated butorphanol tartrate for alleviation of experimentally induced arthritic pain in green-cheeked conures (*Pyrrhura molinae*). **American Journal of Veterinary Research**, v.70, p.1211–1219, 2009.

PAUL-MURPHY, J.R.; SLADKY, K.K.; KRUGNER-HIGBY, L.A.; STADING, B.R.; KLAUER, J.M.; KEULER, N.S.; BROWN, C.S.; HEATH, T.D. Analgesic effects of carprofen and liposome-encapsulated butorphanol tartrate in Hispaniolan parrots (*Amazona ventralis*) with experimentally induced arthritis. **American Journal of Veterinary Research**, v.70, p.1201–1210, 2009.

PEPPAS, N.A.; SAHLIN, J.J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, p. 169-172, 1989.

PEPPAS, N.A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 60, n. 4, p. 110-111, 1985.

PIMPÃO, C. T.; ROCHA, R. M. V. M.; SCHAEFER, R.; WOUK, A. F. P. F.; CIRIO, S. M.; BENATO, E. M., GURGEL, L. G. A.; FRONCZAK, M. A. Avaliação dos efeitos toxicológicos da ivermectina em cães. **Revista Acadêmica**, v.3, n.4, p.19-24, 2005.

POHLMANN, A.R., WEISS, V., MERTINS, O., SILVEIRA, N.P., GUTERRES, S.S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.16, p.305-312, 2002.

POLLETO, F.S.; JAGER, E.; RÉ, M.I.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Rate modulating PHBV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.345, p.70-80, 2007.

RADOMSKA-SOUKHAREV, A. Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p.411–418, 2007.

RAI, S.; PALIWAL, R.; GUPTA, P.N.; KHATRI, K.; GOYAL, A.K.; VAIDYA, B.; VYAS, S.P. Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) as a Rising Tool in Drug Delivery Science: One Step Up in Nanotechnology. **Current Nanoscience**, v.4, p.30-44, 2008.

RETNAKARAN, A.; GRANETT, J.; ENNIS, T. **Insect growth regulators**. In: Kerkut, G., Gilbert, L. (Eds.), **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology**. Pergamon, Oxford, UK, p.529–601, 1985.

RIBEIRO, R.R.; MOURA, E.P.; PIMENTEL, V.M.; SAMPAIO, W.M.; SILVA, S.M.; SCHETTINI, D.A.; ALVES, C.F.; MELO, F.A.; TAFURI, W.L.; DEMICHELI, C., MELO, M.N.; FREZARD, F., MICHALICK, M.S. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.2564–2572, 2008.

RIFFAULT, S.; MEYER, G.; DEPLANCHE, M.; DUBUQUOY, C.; DURAND, G.; SOULESTIN, M.; CASTAGNE, N.; BERNARD, J.; BERNARDET, P.; DUBOSCCLARD, V.; BERNEX, F.; PETIT-CAMURDAN, A.; DEVILLE, S.; SCHWARTZ-CORNIL, I.; ELEOUET, J.F. A new subunit vaccine based on nucleoprotein nanoparticles confers

partial clinical and virological protection in calves against bovine respiratory syncytial virus. **Vaccine**, v.28, p.3722-3734, 2010.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, p.726-737, 2003.

SCHEERLINCK, J.P.; GLOSTER, S.; GAMVRELLIS, A.; MOTTRAM, P.L.; PLEBANSKI, M. Systemic immune responses in sheep, induced by a novel nano-bead adjuvant. **Vaccine**, v.24, p.1124–1131, 2006.

SCHETTINI, D.A.; COSTA VAL, A.P.; SOUZA, L.F.; DEMICHELI, C.; ROCHA, O.G.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.; FREZARD, F. Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.1879–1883, 2005

SCHÖLER, N; HAHN,H; MÜLLER, R.H. LIESENFELD, O. Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v.231, p.167-176, 2002.

SCOTT, N. R. Nanoscience in Veterinary Medicine. **Veterinary Research Communications**, v.31, supl.1, p.139-144, 2007.

SEPPIC. **Seppic**. Disponível em: <http://www.seppic.com/veterinary-vaccine-adjuvants/products-and-ranges-@/1111/view-1112-category.html>. Acesso em dezembro de 2015.

SEVERINO, P.; ANDREANI, T.; MACEDO, A.S.; FANGUEIRO, J.F.; SANTANA, M.H.; SILVA, A.M.; SOUTO, E.B. Current State-of-Art and SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A.; **Princípios de Análise Instrumental**, 5ª Ed. Bookman: Porto Alegre, 2002.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M.J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. **Mutation Research**, v.368, p.171-179, 1996.

SMITH, L.J.; KUKANICH, B.; HOGAN, B.K.; BROWN, C.; HEATH, T.D.; KRUGNER-HIGBY, L.A. Pharmacokinetics of a controlled-release liposome-encapsulated hydromorphone administered to healthy dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.31, p.415–422, 2008.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 139-157, 2001.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B.. **Química Orgânica**, 7a. ed., LTC - Livros, 2001.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

SOUTO, B.E; SEVERINO, P; SANTANA, A.H.M; PINHO, C.S. Nanopartículas de lipídios sólidos: Métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v.34, n.10, p.1762-1769, 2011.

SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. The use of SLN® and NLC® as topical particulate carriers for imidazole antifungal agents. **Die Pharmazie**, v. 61, p. 431-437, 2005.

SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN®, NLC®). **International Journal of Cosmetic Science**, v.30, n.3, p.157–165, 2008.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E. B.; JUNYAPRASERT, V. P.; MÜLLER, R. H. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10 – Development, physicochemical characterization and in vitro release studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.67 p.141-148 2007.

Timofeev, B.A., Bolotin, I.M., Stepanova, L.P., Bogdanov Jr., A.A., Georgiu, K., Malyshev, S.N., Petrovsky, V.V., Klibanov, A.L., Torchilin, V.P. Liposomal diamidine (imidocarb): Preparation and animal studies. **Journal of Microencapsulation**, v.11, p.627–632, 1994.

TIYABOONCHAI, W.; TUNGPRADIT, W.; PLIANBANGCHANG, P. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.337, p.299-306, 2007.

U'REN, L.W.; BILLER, B.J.; ELMSLIE, R.E.; THAMM, D.H.; DOW, S.W. Evaluation of a novel tumor vaccine in dogs with hemangiosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.21, p.113–120, 2007.

UCB VET. **Uzinas Químicas Brasileiras**. Disponível em: <http://www.ucbveter.com.br/arquivos/posologia.aspx?id=6>. Acesso em dezembro de 2015.

UNDERWOOD, C.; van EPS, A.W. **Nanomedicine and veterinary science: The reality and the practicality**. The Veterinary Journal, v.193, p.12–23, 2012.

USUI, T.; KONNAI, S.; TAJIMA, S.; WATARAI, S.; AIDA, Y.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Protective effects of vaccination with bovine leukemia virus (BLV) Tax DNA against BLV infection in sheep. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, p.1201–1205, 2003.

VAIL, D.M.; KRAVIS, L.D.; COOLEY, A.J.; CHUN, R.; MACEWEN, E.G. Preclinical trial of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes in dogs with spontaneously arising malignant tumors. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.39, p.410–416, 1997.

VALLADARES, J.E.; RIERA, C.; GONZALEZ-ENSENYAT, P.; DIEZ-CASCON, A.; RAMOS, G. SOLANO-GALLEGO, L.; GALLEG0, M.; PORTUS, M.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J. Long term improvement in the treatment of canine leishmaniosis using an antimony liposomal formulation. **Veterinary Parasitology**, v.97, p.15–21, 2001.

VANDAMME, K.; VESNA, M.; ERIC, C.; PAUL, R.J.; CHRIS, V. Adjuvant effect of Gantrez(R)AN nanoparticles during oral vaccination of piglets against F4+enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.139, p.148–155, 2011.

VEIR, J.K.; LAPPIN, M.R.; DOW, S.W. Evaluation of a novel immunotherapy for treatment of chronic rhinitis in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.8, p.400–411, 2006.

VENKATRAMAN, S.S.; JIE, P.; MIN, F.; FREDDY, B.Y.C.; LEONG-HUAT, G. Micelle-like nanoparticles of PLA–PEG–PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v.298, p.219–232, 2005.

VENUGANTI, V.V.; PERUMAL, O.P. **Nanosystems for Dermal and Transdermal Drug Delivery**, in Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization, PATHAK, Y.; THASSU, D. Editors., Informa Healthcare: New York. p.126-155, 2009.

VERMINNEN, K.; BEECKMAN, D.S.; SANDERS, N.N.; De SMEDT, S.; VANROMPAY, D.C. Vaccination of turkeys against *Chlamydophila psittaci* through optimised DNA formulation and administration. **Vaccine**, v.28, p.3095–3105, 2010.

VITORINO, C.; CARVALHO, F.A.; ALMEIDA, A.J.; SOUSA, J.J.; PAIS, A.A.C.C. The size of solid lipid nanoparticles: an interpretation from experimental design. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.84, p.117–130, 2011.

WAMBURA, P.N. Formulation of novel nano-encapsulated Newcastle disease vaccine tablets for vaccination of village chickens. **Tropical Animal Health and Production**, v.43, p.165–169, 2010.

WANG, C.; WANG, M.Q.; YE, S.S.; TAO, W.J.; DU, Y.J. Effects of copper-loaded chitosan nanoparticles on growth and immunity in broilers. **Poultry Science**, v.90, p.2223–2228, 2011.

WANG, M.Q.; XU, Z.R.; LI, W.F.; JIANG, Z.G. Effect of chromium nanocomposite supplementation on growth hormone pulsatile secretion and mRNA expression in finishing pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.93, p.520-525, 2009.

WEISS, R.C.; COX, N.R.; MARTINEZ, M.L. Evaluation of free or liposomeencapsulated ribavirin for antiviral therapy of experimentally induced feline infectious peritonitis. **Research in Veterinary Science**, v.55, p.162–172, 1993.

WESTESEN, K.; BUNJES, H. Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? **International Journal of Pharmaceutics**, v.115, p.129-131, 1995.

WISE, A.J.; LERCHE, P.; CLEALE, R.M.; MUIR, W.W. 2010. Investigation of escalating and large bolus doses of a novel, nano-droplet, aqueous 1% propofol formulation in cats. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.37, p.250–257, 2010.

WISSING, S. A., KAYSER, O., MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.1257-1272, 2004.

WUNSCH, L.A.; SCHMIDT, B.K.; KRUGNER-HIGBY, L.A.; SMITH, L.J. A comparison of the effects of hydromorphone HCl and a novel extended release hydromorphone on arterial blood gas values in conscious healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, v.88, p.154–158, 2009.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v.6, p.112-115, 2008.

YAGUCHI, K.; OHGITANI, T.; NORO, T.; KANESHIGE, T.; SHIMIZU, Y. Vaccination of chickens with liposomal inactivated avian pathogenic Escherichia coli (APEC) vaccine by eye drop or coarse spray administration. **Avian Diseases**, v.53, p.245–249, 2009.

YUAN, H.; WANG, L.L.; DU, Y.Z.; HU, F.Q.; ZENG, S. Preparation and characteristics of nanostructured lipid carriers for control-releasing progesterone by melt-emulsification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.60(2): p.174-9, 2007.

ZHANG, N.; PING, Q.; HUANG, G.; XU, W.; CHENG, Y.; HAN, X. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.327, p.153–159, 2006.

ZHANG, W.; YIN, Z.; LIU, N.; YANG, T.; WANG, J.; BU, Z.; WU, D. DNA-chitosan nanoparticles improve DNA vaccine-elicited immunity against Newcastle disease virus through shuttling chicken interleukin-2 gene. **Journal of Microencapsulation**, v.27, p.693–702, 2010.

ZOECON CORPORATION. **Technical Bulletin on Altosid**: Toxicological Properties, 1974.