

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARLOS VIDAL BRASILEIRO

**TESTE DE TOXICIDADE DE ANTIBIÓTICO E NANOFORMULAÇÃO EM
EMBRIÕES DE GALINHA POR DIFERENTES VIAS DE ADMINISTRAÇÃO**

Uberlândia-MG

2023

CARLOS VIDAL BRASILEIRO

**TESTE DE TOXICIDADE DE ANTIBIÓTICO E NANOFORMULAÇÃO EM
EMBRIÕES DE GALINHA POR DIFERENTES VIAS DE ADMINISTRAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Professora Doutora Belchiolina Beatriz Fonseca

Uberlândia-MG

2023

CARLOS VIDAL BRASILEIRO

**TESTE DE TOXICIDADE DE ANTIBIÓTICO E NANOFORMULAÇÃO EM
EMBRIÕES DE GALINHA POR DIFERENTES VIAS DE ADMINISTRAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Uberlândia, 29 de junho de 2023.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Belchiolina Beatriz Fonseca

UFU

Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota

UFU

Prof. Dr. Matheus Matioli Mantovani

UFU

RESUMO

O teste de toxicidade é de grande importância para a indústria farmacêutica e química e em sua maior parte utiliza camundongos. No entanto, a cada dia mais a pressão para extinguir o uso de modelos animais vem aumentando. Os testes feitos em embriões de galinha (EG), são procedimentos mais rápidos, menos onerosos e com menos barreiras éticas. Assim, o objetivo desse estudo é avaliar se as diferentes vias de inoculação interferem na toxicidade no embrião e viabilizar o uso desse modelo em testes com antibióticos melhorados ou não por nanobiotecnologia. Para esse estudo, foram utilizados um total de 182 embriões de galinha (EG) com 11 dias de incubação. Foram testadas quatro vias de inoculação, sendo elas Membrana da Casca (MC), Membrana Corioalantoide (CAM), Amnio (AM) e Alantoide (AL) e dois fármacos, norfloxacino (NOR) e uma formulação nanohíbrida da NOR os quais foram utilizados em três (3) diferentes diluições (50µg/EG, 25µg/EG e 12,5µg/EG). Em paralelo um controle negativo foi inserido para cada via. Para cada grupo foram utilizados 6 EG a exceção do âmnio em que havia 8 embriões por grupo. Os ovos foram então incubados artificialmente e observados diariamente para avaliação da mortalidade e embriodiagnóstico dos EG que vierem a óbito. No 17 DDI, os EG sobreviventes foram pesados e eutanasiados. Com esse estudo, pode-se evidenciar vias de inoculação em embriões de galinha que apresentam a maior potência da PEC@LIP/NOR comparada a NOR na inoculação via CAM (que é a via de acesso direto aos vasos sanguíneos). Também é possível verificar que a via MC pode levar a perda de fármaco provavelmente devido a menor permeabilidade da membrana.

Palavras-chave: Modelo Animal Alternativo; Nanoformulação; Toxicidade.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	5
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1	Sobre a toxicidade e o embrião da galinha	6
2.2	Sobre a norfloxacin.....	7
3	METODOLOGIA.....	9
4	RESULTADOS	11
5	DISCUSSÃO.....	13
6	CONCLUSÃO.....	14
	REFERÊNCIAS	15

1 INTRODUÇÃO

O teste de toxicidade tem grande importância para a indústria farmacêutica e química. A aplicação do teste em sua maior parte utiliza camundongos e envolve muitos segmentos burocráticos com órgãos de ética animal e um processo demorado de criação dos animais. Os testes feitos em embriões de galinha (EG) são procedimentos mais rápidos, menos onerosos e com menos barreiras éticas (Fonseca *et al.*, 2021).

Os embriões de galinha (EG) são utilizados em diversas áreas importantes da medicina em pesquisas no geral, tais como tratamento de câncer (Wachholz *et al.*, 2021), teste de angiogênese (Ribatti, 2008), isquemia (Fauzia *et al.*, 2018) e na avaliação de toxicidade (Kue *et al.*, 2015).

A norfloxacin (NOR) é um antibiótico do grupo das quinolonas de terceira geração, utilizada para tratamento em infecções bacterianas graves, agindo contra cepas Gram positivas e Gram-negativas. Nos últimos anos vem aumentando o desenvolvimento de antibióticos melhorados por nanobiotecnologia que tem como vantagem melhorar o sistema de entrega do fármaco e aumentando intervalo entre doses. No entanto, fármacos melhorados por nanobiotecnologia são mais potentes requerendo normalmente menor dose (Lopes, 1992).

Devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos, às inúmeras vantagens de fármacos melhorados e a necessidade de modelos animais alternativos, o uso do embrião de galinha pode ser útil para testes com nanoformulações. No entanto, embora se use o embrião de galinha com frequência para vários objetivos, a exploração da via de inoculação ainda é incipiente (Ahmad *et al.*, 2016).

O grupo de pesquisadores coordenado pela orientadora desse projeto desenvolveu uma formulação híbrida da NOR com pectina e lipossomas (PCT@LIP/NOR), uma nanoestrutura que encapsula a NOR e a protege da degradação até chegar a área de atuação, aumentando assim a potência e tempo de ação do fármaco (RIBEIRO *et al.*, 2020). Essa nanoformulação foi testada *in vitro* e em roedores e os trabalhos mostraram uma formulação com características superiores a norfloxacin (Paula *et al.*, 2020).

Este trabalho foi instigado pelo fato de o grupo do laboratório ser referência em pesquisas com embriões de galinha e possuir uma nanoformulação comprovadamente supramolecular comparada ao fármaco comercial. Assim, o objetivo deste trabalho é a realização do teste de toxicidade da NOR comercial e o seu híbrido PCT@LIP/NOR em embriões de galinha como modelo animal entregues por diferentes vias e em diferentes concentrações, e avaliar a interferência da via e do fármaco sobre os embriões.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sobre a toxicidade e o embrião da galinha

Os métodos atuais para avaliação de toxicidade focam na melhor utilização dos animais, diminuindo a quantidade demandada por estudo. Em sua maior parte, são utilizados camundongos por serem facilmente criados, manipulados e por serem relativamente baratos, além de ter um perfil metabólico hepático razoavelmente similar aos dos humanos. Manter um padrão na utilização das linhagens dos animais favorece a coleta de dados e a utilização desses para estudos posteriores (NRC, 2004).

Em testes de toxicidade várias categorias são usadas para a classificação de toxicidade com base na exposição: aguda, subaguda, subcrônica e crônica. Para que a toxicidade seja avaliada de acordo com essa classificação, se observa o tempo de contato, sendo a dose aguda alcançada em uma única dose, e as demais em doses repetidas em períodos de meses ou anos. A via de exposição também deve ser considerada quando se trata de toxicidade podendo ser oral, inalatória ou tópica (Morris-Schaffer; McCoy, 2020).

Comparativamente, a utilização dos EG em relação aos modelos de mamíferos tradicionais se mostra amplamente vantajoso, como em relação ao baixo custo, tempo de maturação menor e a facilidade de aceitação em comitês de ética. Como a taxa reprodutiva das galinhas é maior que a de mamíferos sua utilização pode conter mais quantidade de indivíduos e com uma reposição mais rápida. A aquisição de ovos fecundados também é menos onerosa que a manutenção de criações de mamíferos para testes constantes. Além disso, os embriões de galinha são mais facilmente manipulados que mamíferos despendendo menos tempo de manejo e técnicas mais simples de aplicações (Ribeiro *et al.*, 2022).

De acordo com a maturidade do desenvolvimento, o embrião de galinha é dividido em 3 estágios: 1) incubação, o inicial até 7 dias de incubação (DDI); 2) intermediário de 8-14 DDI; 3) final que é de 15 a 21 DDI (Moran, 2007). O desenvolvimento dos EG corresponde a 21 dias e durante o primeiro dia os vasos sanguíneos extraembrionários passam a ser visíveis no saco vitelínico próximo das 23-24 horas de incubação (HI). Batimentos cardíacos detectáveis em 33-38 HI, circulação entre 51-56 HI. O alantoide se desenvolve em 3 DDI e nesse mesmo período o âmnio envolve o embrião. Com 6-7 DDI ocorre a fusão do alantoide com o corion e se forma a membrana corioalantoide (CAM) e passam a ser visíveis. Isso possibilita o início de muitos testes a partir do 7 DDE (Hamburger; Hamilto, 1992; Sheng 2010).

Há diferentes vias de inoculação em embriões de galinha. Tais vias são muito exploradas

em testes com vacinas nestes modelos biológicos. No entanto não há trabalhos que apresentem diferença entre vias para fármacos ou nanoformulações. Devido a estrutura do embrião, é possível que a aplicação do fármaco em diferentes vias no EG pode simular as vias de inoculação ou tratamento em animais nascidos. As principais vias para a aplicação são a gema, membrana corioalantoide (CAM), alantoide (AL), membrana da casca (MC), âmnio (AM) e saco vitelínico (SV) (Ribeiro *et al.*, 2022).

No embrião de galinha, o AL está em contato com a CAM (Gabrielli; Accili, 2010), então medicamentos de via subcutânea ou intramuscular poderiam ser aplicados nessas vias. A diluição da droga pode atingir vasos da CAM e do SV atingindo os embriões. A inoculação pelo AM pode simular a administração de remédios de via oral, porque o embrião ingere o conteúdo do âmnio durante seu desenvolvimento (Moran, 2007). O SV está diretamente ligado ao intestino, e a medida que o embrião se desenvolve ele absorve a gema (Willems *et al.*, 2019), assim o SV provavelmente deve ser a melhor via para teste de drogas de absorção intestinal. A CAM tem um alto número de vasos sanguíneos (REIZIS, 2005), possibilita o acesso da droga direto com os vasos sanguíneos, sendo assim essencial para drogas de administração parenteral (Ribeiro *et al.*, 2022).

2.2 Sobre a norfloxacin

A norfloxacin é da classe das quinolonas, que faz parte de um grupo de antimicrobianos de largo espectro, sendo utilizada no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, também agindo com outros micro-organismos como a *Chlamydia*. As quinolonas estão relacionados com o ácido nalidíxico, fármaco sintetizado a partir da cloroquina em 1962 (Lopes, 1992).

O ácido 1-etil-6-fluor-1,4-dihidro-7-(1-piperazinil)-4-oxoquinolona-3-carboxílico que é a NOR, é um pó cristalino com coloração branca ou amarelo-pálida, higroscópica, ligeiramente solúvel em água, ligeiramente solúvel em acetona e em álcool e solúvel em N-dimetilformamida. Fotossensível, a norfloxacin deve ser armazenada em um recipiente fechado, protegido da luz (British Pharmacopoeia, 1998).

A NOR é uma quinolona fluorada (flouroquinolonas), esses agentes inibem a topoisomerase II uma girasse bacteriana, a enzima que produz a super-helicoidização negativa do DNA que permite a transcrição ou replicação. As fluoroquinolonas ao serem administradas, se acumula em diversos tecidos principalmente nos rins, próstata e pulmões, não atravessa a barreira hematoencefálica e tem uma eliminação parcialmente pelo metabolismo hepático.

Antiácidos de alumínio e magnésio interferem a absorção das quinolonas (Ritter *et al.*, 2016).

Embora de amplo espectro, A NOR é uma molécula de baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade em humanos e em animais em administração oral, o que pode limitar sua atuação antimicrobiana (Dong *et al.*, 2011). Uma das maneiras de melhorar fármacos como a NOR é a inserção de novas terapias com a utilização de fármacos nanoestruturados, com o objetivo de melhorar a atividade antimicrobiana dos antibióticos tradicionais (Paula *et al.*, 2020).

A PCT@LIP/NOR é uma nanoformulação híbrida de lipossomo e pectina que apresenta uma estabilidade físico-química por 180 dias de armazenamento, propriedades estruturais desejáveis, que prolongaram o perfil de liberação da NOR por 11 horas (9 horas a mais que a NOR comercial) e aumenta a capacidade antimicrobiana contra cepas bacterianas multirresistentes (Ribeiro *et al.*, 2020).

3 METODOLOGIA

O experimento foi conduzido no Laboratório de Incubação de Aves (LIAVE) da Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Umuarama, Uberlândia/MG. Foram utilizados ovos de embrionados *Gallus gallus* (Hy-Line) com 11 dias de incubação (DDI). Os ovos foram incubados em incubadora artificial (Premium ecológica®) a 37°C e 55-60% de umidade e girados automaticamente a cada duas horas.

Esse trabalho foi aprovado pelo CEUA protocolo nº008/21

Para esse estudo, foi utilizado um total de 182 embriões de galinha. Foram testadas quatro vias de inoculação, sendo elas membrana da casca (MC), membrana corioalantoide (CAM), amnio (AM) e alantoide (AL) e dois fármacos, NOR e PEC@LUV/NOR em 3 diferentes diluições (50µg/EG, 25µg/EG e 12,5µg/EG). Para cada grupo, foram utilizados 6 EG, a exceção dos grupos da via amnio, uma vez que essa via apresenta menor chance de erro, tendo-se optado pela utilização de 8 embriões. Paralelamente, foram utilizados controles negativos para cada via sem a presença do fármaco ou da nanoformulação. Dessa forma, havia um total de 28 grupos.

Para a aplicação na MC foi feita uma perfuração na casca sobre a câmara de ar (CA) e com uma agulha de injeção, a aplicação na CA do ovo (Gebhardt e van Logten, 1968). Para a CAM, foi aberta uma janela no topo do ovo e a MC foi cuidadosamente removida, deixando exposta a CAM para a aplicação (Zhu *et al.*, 2014). Para AM, realizou-se uma perfuração centro-lateral guiada com ovoscópio no sentido do embrião, tomando cuidado para não perfurar. Exclusivamente para o AM, devido à dificuldade dessa via, usamos um corante azul alimentício inócuo para termos certeza que a inoculação foi correta. Para o AL fizemos uma perfuração logo abaixo do limite da CA e introduziremos a agulha perpendicularmente para realizar a aplicação (Fonseca *et al.*, 2021).

Os ovos foram então incubados e observados diariamente para avaliação da mortalidade e embriodiagnóstico dos EG que vierem a óbito. No 17 DDI, os EG sobreviventes foram eutanasiados e foi realizada a pesagem dos embriões sem os anexos e o embriodiagnóstico.

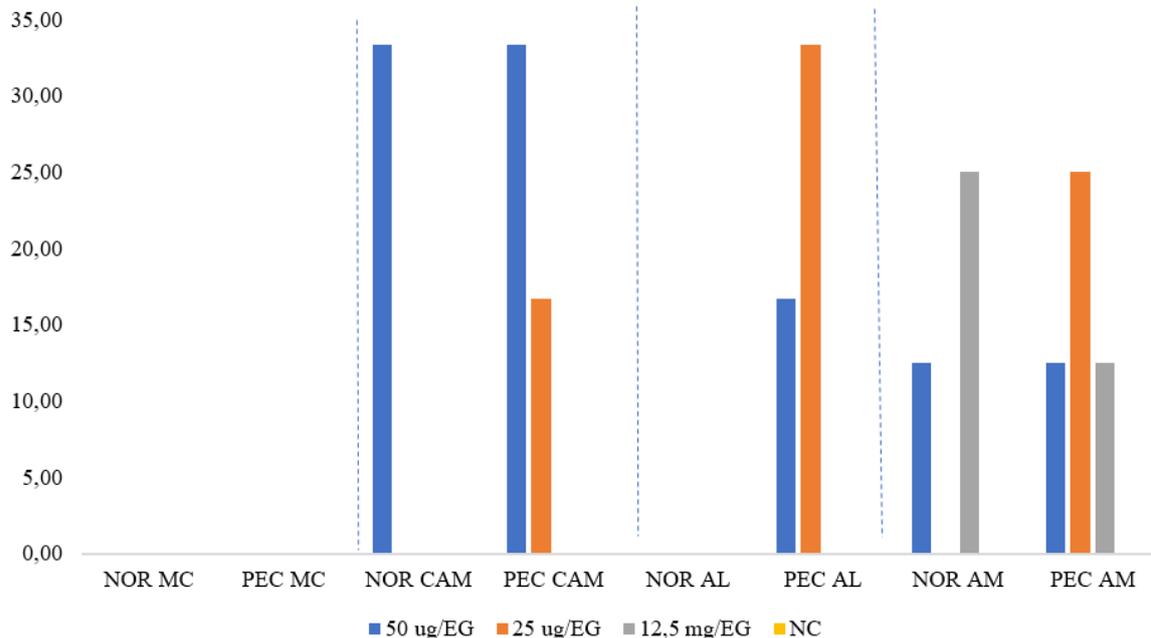
Para análise dos dados, foi coletado o número de mortos e a mortalidade foi calculada em percentagem. Foi realizada estatística descritiva para análise. Para avaliação do peso, foi realizado um ajuste para o peso inicial dos ovos de 50 gramas. Isso porque há uma desuniformidade no peso dos ovos. Assim, os ovos foram pesados aos 11 DDI e os embriões aos 17 DDI. Para cálculo do peso ajustado, foi usada a seguinte fórmula: (50 X peso do embrião sem anexos aos 17 DDI)/peso do ovo aos 11 dias de incubação. Após o ajuste foi realizado o

teste da normalidade e o teste da ANOVA seguido pelo teste de Tukey, considerando a diferença de média entre as vias para NOR e para PEC@LUV/NOR separadamente. Também foi usada ANOVA entre NOR e PEC@LUV/NOR dentro da mesma via. Foi considerado um nível de significância de 95% ($p < 0,05$), usando o programa GraphPad Prism 9.02.

4 RESULTADOS

Nas inoculações na MC, não ocorreu nenhuma mortalidade em nenhuma das formulações e concentração dos fármacos (Figura 1). Para a via CAM, houve mortalidade de 33,3% (1/3) para as doses de NOR e PEC na concentração de 50µg/EG. Ocorreu mortalidade de 16,67% (1/6) nessa via para a dose de 25µg/EG apenas para a PEC. As demais inoculações dessa via não apresentaram mortalidade. Para a via AL, apenas a PEC apresentou mortalidade. Para a concentração de 50µg/EG, houve 16,67% (1/6) de mortalidade e para 25µg/EG houve 33,33% (1/3), não apresentando mortalidade na concentração de 12,5µg/EG. A via AM apresentou uma mortalidade de 12,5% nas duas formulações NOR e PEC na concentração 50µg/EG. Na concentração de 25µg/EG, apenas a PEC apresentou mortalidade de 25%(1/4), enquanto na concentração de 12,5µg/EG a NOR apresentou 25%(1/4) de mortalidade e a PEC 12,5%(1/8).

Figura 1. Percentual de mortalidade dos embriões inoculados com Norfloxacin (NOR) e PEC/LUV@NOR (PEC) em três diferentes doses (50ug/EG, 25ug/EG, 12,5ug/EG), pelas vias membrana da casca (MC), membrana corioalantoide (CAM), alantoide (AL) e amnio (AM). EG: Embrião de Galinha. As linhas pontilhadas azuis deparam as diferentes vias



Fonte: Autoria Própria, 2023.

Quando foi avaliado o peso dos embriões inoculados com 50ug/EG, foi detectada uma diferença relevante comparando o antibiótico e sua nanoformulação no grupo inoculado na CAM (Tabela 1). Dentro das outras vias, não foram encontradas diferenças (Tabela 1). Não

houve diferença estatística no peso do embrião entre as diferentes vias para embriões inoculados com NOR ou a PEC.

Tabela 1. Média de peso dos embriões (aos 17 DDI) inoculados com 50µg/EG de norfloxacina (NOR) e PEC@LUV/NOR (PEC) nas vias membrana da casca (MC), membrana corioalantoide (CAM), alantoide (AL) e amnio (AM). Em parêntese é o valor +/- o desvio padrão.

MC			CAM			AL			AM		
PEC	NOR	CN	PEC	NOR	CN	PEC	NOR	CN	PEC	NOR	CN
24,09 (2,06)	24,71 (1,36)	25,62 (1,09)	22,38 (1,10)a	25,66 (,062)b	25,12 (0,91)b	24,26 (0,86)	25,62 (1,02)	25,12 (1,71)	23,76 (0,95)	24,01 (1,82)	25,40 (1,79)

Fonte: Aatoria Própria, 2023.

5 DISCUSSÃO

Como não houve mortalidade na MC trabalha-se na hipótese da não ou pouca permeabilidade da droga nessa membrana. A MC é responsável pela troca de oxigênio com a CAM (Gabrielli; Accili, 2010), e é formada por duas camadas, interna e externa, com os poros com 12,6nm e 0,53nm respectivamente (Kutchai; Steen, 1971). A estrutura da NOR é detectada entre 228-334nm e da sua forma híbrida, a PEC, entre 253-425nm (Ribeiro *et al.*, 2020), se mostrando uma difícil permeabilidade nessa membrana.

A via CAM apresentou uma mortalidade de 33,3% na dose de 50µg/EG para as duas formulações, pois essa via é extremamente vascularizada e responsável pela reabsorção de água e eletrólitos (Gabrielli; Accili, 2010), sendo uma via muito estudada (Ribeiro *et al.*, 2022), para a simulação de uma via parenteral, ou tópica de muito sucesso. Assim, provavelmente, uma maior absorção dos fármacos expôs os embriões a uma maior lesão. Também é notável a diferença de peso dos embriões para a exposição as diferentes formulações; os embriões inoculados com a PEC tiveram um peso menor com relação aos inoculados com a NOR, provavelmente devido à maior estabilidade e perfil de liberação da PEC@LIP/NOR. Fármacos melhorados por nanobiotecnologia são mais potentes, apresentam meia vida maior e assim uma menor dose ou um maior intervalo entre doses é recomendado (Ribeiro *et al.*, 2020).

A via AL se apresenta uma via interessante por estar em contato direto com a CAM, assim tendo a capacidade reabsorção de água e eletrólitos; porém como AL armazena as excretas do embrião (Fisher; Eakin, 1957) o fluido presente diminui a concentração dos fármacos a serem reabsorvidos. Essa característica pode explicar o porquê não houve óbitos para a aplicação da NOR, mas houve para sua forma híbrida PEC nas concentrações de 50µg/EG e 12,5µg/EG. No entanto, não houve diferença no peso do embrião entre PEC e NOR por essa via.

A via AM apresentou uma mortalidade variada para cada uma das aplicações entre 12,50% e 25%. As mortalidades provavelmente aconteceram porque o AM, além de ser uma proteção física, é responsável primariamente pela nutrição do embrião junto com a gema. Com o desenvolvimento do embrião, ele passa a ser digerido de forma oral e absorvido pelo pequeno intestino do embrião, assim causando uma absorção parcial de seu conteúdo (Moran, 2007).

6 CONCLUSÃO

Com esse estudo, foi possível evidenciar que, na via de inoculação CAM, que é a via de acesso direto aos vasos sanguíneos, a PEC@LIP/NOR foi mais potente quando comparada a NOR. Já na via de inoculação MC, evidenciou-se uma perda de fármaco, uma vez que a permeabilidade da membrana é reduzida por esta via, prejudicando a concentração final dos princípios ativos administrados nos tecidos-alvo.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I.; ARSALAN, A.; ALI, S. A.; BANO, R.; MUNIR, I.; SABAH, A. Formulation and stabilization of norfloxacin in liposomal preparations. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.91, p.208-215, 2016.
- BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity--prospects for tiered testing strategies. **Toxicology in Vitro**, v.18, n.2, p.227-30, 2004.
- BRITISH PHARMACOPOEIA. Norfloxacin. In: BRITISH PHARMACOPOEIA. **Monographs: medicinal and pharmaceutical substances**. London: Crown, 1998.
- DONG, Z.; XIE, S.; ZHU, L.; WANG, Y.; WANG, X.; ZHOU, W. Preparation and in vitro, in vivo evaluations of norfloxacin-loaded solid lipid nanoparticles for oral delivery. **Drug Deliv.**, v.18, p.441-450, 2011.
- FAUZIA, E.; BARBHUYAN, T. K.; SHRIVASTAVA, A. K.; KUMAR, M.; GARG, P.; KHAN, M. A.; ROBERTSON, A. A. B.; RAZA, S. S. Chick Embryo: A Preclinical Model for Understanding Ischemia-Reperfusion Mechanism. **Front Pharmacol.**, v.9, p.1034-1038, 2018.
- FISHER, J. R.; EAKIN, R. E. Nitrogen Excretion in Developing Chick Embryos. **Development**, v.5, p.215-224, 1957.
- GABRIELLI, M. G.; ACCILI, D. The Chick Chorioallantoic Membrane: A Model of Molecular, Structural, and Functional Adaptation to Transepithelial Ion Transport and Barrier Function during Embryonic Development. **J Biomed Biotechnol**, v.2010, n.1, p.1-12, 2010.
- GUY, J. S. Isolation and propagation of coronaviruses in embryonated eggs. **Methods Mol Biol**, v.454, p.109-117, 2008.
- HAMBURGER, V.; HAMILTO, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Dev Dyn**, v.195, p. 231-272, 1992.
- HUBBARD, R. C.; YOUNG, C. The LD50 A Tradition in Need of Change. **Journal of the American Medical Association**, v.252, p.3249-3252, 1984.
- KUTCHAI, H.; STEEN, J. B. Permeability of the shell and shell membranes of hens' eggs during development. **Respir Physiol**, v.11, p.265-278, 1971.
- KUE, C.S.; TAN, K. Y.; LAM, M. L.; LEE, H. B. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs. **Exp Anim.**, v.64, p.129-138, 2015.
- LOPES, H. V. Novos antimicrobianos: progressos e perspectivas. **Rev. Bras. Med.**, v.79, p.177-206, 1992.
- MORAN, E. T. Nutrition of the Developing Embryo and Hatchling. **Poult Sci**, v.86, p. 1043-1049, 2007.

NRC (National Research Committee). **Intentional Human Dosing Studies for EPA Regulatory Purposes: Scientific and Ethical Issues: Appendix A, Values and Limitations of Animal Toxicity Data.** In Committee on the Use of Third Party Toxicity Research with Human Research Participants Science, Technology, and Law Program; National Research Council, Canada, 2004.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). **Test Guideline 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure;** Organization for Economic Co-operation and Development Guideline for Testing of Chemicals, 2001a.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). **Test Guideline 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method;** Organization for Economic Co-operation and Development Guideline for Testing of Chemicals, 2001b.

PAULA, E.; LIMA, F. F.; OLIVEIRA, J. D.; RIBEIRO, L. N. M. Liposome-Based Delivery of Therapeutic Agents. In: OPARA, E. C. (ed). **Controlled Drug Delivery Systems.** Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis, 2020; pp. 297–323.

RIBATTI, D. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis. **Rom J Morphol Embryol**, v.49, p. 131-135, 2008.

RIBEIRO, L. N. M.; SCHLEMPER, A. E.; SILVA, M. V.; FONSECA, B. B. Chicken embryo: a useful animal model for drug testing? **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** v.26, n.13, p.4828-4839, 2022.

RITTER, J. M.; FLOWER, R.; HENDERSON, G.; LOKE, Y. K.; MCEWAN, D. RANG, H. P. ; **Rang & Dale Farmacologia.** 9a. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

RUFINO, J. L. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de tetraciclina, doxiciclina, azitromicina, norfloxacina e ciprofloxacina em formulações farmacêuticas.** 2009. 146f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2009.

SHENG, G. Primitive and definitive erythropoiesis in the yolk sac: a birds eye view. **Int J Dev Biol**, v.54, p. 1033-1043, 2010.

TREVAN, J. W. The error of determination of toxicity. **Proc. R. Soc. London**, v.1, p.111-117, 1927.

WACHHOLZ, G. E.; RENGEL, B. D.; VARGESSON, N.; FRAGA, L. R. From the Farm to the Lab: How Chicken Embryos Contribute to the Field of Teratology. **Front Genet**, v.12, 672-676, 2021.

WILLEMS, E.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J.; EVERAERT, N. Importance of albumen during embryonic development in avian species , with emphasis on domestic chicken Importance of albumen during embryonic development in avian species , with emphasis on domestic chicken. **Worlds Poult Sci J.**, v.70, p.503-518, 2019.