

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ANA CLARA FEITOSA SILVA

**TESTE DE TOXICIDADE DE LIDOCAÍNA E INDOMETACINA E SUAS
RESPECTIVAS NANOFORMULAÇÕES EM DIFERENTES VIAS EM EMBRIÃO
DE GALINHA**

Uberlândia

2024

ANA CLARA FEITOSA SILVA

**TESTE DE TOXICIDADE DE LIDOCAÍNA E INDOMETACINA E SUAS
RESPECTIVAS NANOFORMULAÇÕES EM DIFERENTES VIAS EM EMBRIÃO
DE GALINHA**

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: Belchiorina Beatriz Fonseca

Coorientador: Simone Sommerfeld

Uberlândia

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me guiar pelo melhor caminho e por colocar pessoas incríveis na minha jornada. À minha incrível orientadora, Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca, que não só é uma profissional excepcional, mas também uma amiga que me acolheu e apoiou em todas as etapas, abrindo portas e guiando não apenas nos trabalhos acadêmicos, mas também nas decisões da vida. Gostaria de expressar minha gratidão à minha coorientadora, Dra. Simone Sommerfeld, cujo conhecimento é inestimável, e que sempre se mostrou disposta a me ajudar além do esperado, deixando um legado de ensinamentos e conselhos. Sua orientação foi uma verdadeira luz em minha vida, serei eternamente grata por toda ajuda. À minha mãe Fabiana, ao meu pai Joaquim, e meus irmãos, por acreditarem na minha capacidade de concluir essa jornada, e pelo apoio incondicional que foi o verdadeiro impulso para chegar até aqui, nada disso seria possível sem o apoio de vocês. Ao meu namorado, Gabryell, por todo o apoio, ajuda, dedicação e paciência, que foram essenciais para a conclusão deste ciclo. Aos meus queridos amigos, “prestadores de atenção”, por terem sido uma família, pelos momentos vividos e por tornarem a faculdade um ambiente mais leve e pelos laços criados que serão eternamente lembrados. E em especial, minha amiga Nathália, Silas, Nicole e Vinícius que foram minha base nesse período. À equipe do LADOC, em especial à Dra. Lara, pelos valiosos ensinamentos concedidos e por sempre estar disposta a me ensinar, tanto em sala de aula quanto nas atividades práticas de laboratório.

RESUMO

Para comercialização e uso de fármacos de maneira segura, é fundamental conhecer sua janela terapêutica e principalmente sua toxicidade. Visando eficácia, tempo hábil, metabolismo, desenvolvimento fisiológico rápido, menos estresse ao animal e menos burocracias éticas, justifica-se o uso de embriões de galinha (EG) como alternativa de pesquisa. O objetivo desse estudo foi avaliar se o EG pode ser um modelo para testes de toxicidade com fármacos e suas nanoformulações e a interferência da via de inoculação nos resultados. Para esse estudo, foram utilizados 572 EG com 11 dias de incubação. Foram testadas quatro vias de inoculação, sendo elas a Membrana da Casca (MC), Membrana Corioalantoide (CAM), Amnio (AM) e Alantoide (AL) e foi analisada a toxicidade de quatro medicamentos, a lidocaína comercial (LC), a indometacina comercial (IC) e suas nanoformulações (LN e IN respectivamente). Foram utilizadas 5 diferentes diluições por fármaco e para cada diluição foram utilizados seis EG. Os ovos foram incubados artificialmente e observados diariamente para avaliação da mortalidade e embriodiagnóstico dos EG que vieram a óbito até os 16 dias de incubação. O uso de embriões de galinhas sugeriu um modelo prático, acessível e eficiente, essencial para a obtenção dos resultados que mostram que a lidocaína nanoformulada teve uma taxa de mortalidade similar à da lidocaína convencional, enquanto a indometacina nanoformulada demonstrou uma taxa de mortalidade mais elevada em comparação com a indometacina comercial.

Palavras-chave: Embriodiagnóstico; Vias de inoculação; Modelo animal alternativo.

ABSTRACT

For the safe marketing and use of drugs, it is essential to know their therapeutic window and especially their toxicity. Aiming at efficiency, timeliness, metabolism, rapid physiological development, less stress to the animal and less ethical bureaucracy, the use of chicken embryos (CE) as a research alternative is justified. The objective of this study was to evaluate whether CE can be a model for toxicity tests with drugs and their nanoformulations and the interference of the inoculation route on the results. For this study, 572 CE were used with 11 days of incubation. Four inoculation routes were tested, these being the Shell Membrane (SM), Chorioallantoic Membrane (CAM), Amnio (AM) and Allantois (ALA) and the toxicity of four drugs was analyzed, commercial lidocaine (CL), indomethacin (CI) and its nanoformulations (NL and NI respectively). Were used 5 different dilutions per drug and for each dilution six CE were used. The eggs were artificially incubated and observed daily to assess mortality and embryodiagnosis of CEs that died within 16 days of incubation. Overall, considering all doses, the mortality rate of commercial Lidocaine was similar to that of nanoformulated Lidocaine, while the mortality of nanoformulated Indomethacin was higher than that of commercial Indomethacin via the AM and CAM pathways. The use of chicken embryos suggested a practical, accessible and efficient model, essential for obtaining results showing that nanoformulated lidocaine had a similar mortality rate to conventional lidocaine, while nanoformulated indomethacin demonstrated a higher mortality rate compared to commercial indomethacin.

Keywords: Embryodiagnosis; Inoculation routes; Alternative animal model.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 Teste de toxicidade	8
2.2 Embriões de galinha como modelo animal alternativo	9
2.3 Lidocaína	11
2.4 Nanoformulação de Lidocaína	12
2.5 Indometacina.....	13
2.6 Nanoformulação de Indometacina	14
3. METODOLOGIA.....	15
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO.....	21
6. CONCLUSÃO.....	24
7. REFERÊNCIAS.....	25

1. INTRODUÇÃO

Os testes de toxicidade de drogas desempenham um papel fundamental em diversas áreas da ciência, indústria e saúde pública. O teste determina o potencial de certas substâncias causarem danos à saúde, além de avaliar a toxicidade sistêmica aguda. São utilizados para classificar e rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação (Valadares, 2006).

À medida que a ciência avança, novos meios de estudos são utilizados e o uso de embriões de galinhas apresenta inúmeras vantagens quando comparados aos modelos de estudo tradicionais que utilizam mamíferos, como baixo custo, curto tempo de desenvolvimento, rápida velocidade de absorção e distribuição e taxa de excreção acelerada. É um modelo altamente controlado, acessível e relativamente transparente no qual a fisiologia normal, a patologia da doença e as consequências da manipulação experimental podem ser facilmente visualizadas, permitindo experimentos simplificados e econômicos (Kain *et al.*, 2012).

A lidocaína (LC) é um anestésico local amplamente utilizado, suas vantagens incluem boa eficácia, início rápido de ação, versatilidade e ampla aplicação. Esse fármaco inibe reversivelmente processos de excitação e condução do impulso nervoso ao longo das fibras nervosas sem produzir inconsciência. Suas vantagens são obtidas pelo seu mecanismo de ação, no qual o fármaco se liga aos canais iônicos seletivos de sódio nas fibras nervosas, inibindo a permeabilidade ao sódio, dessa forma a fibra não despolariza e não conduz o potencial, ou seja, a dor. Sua ação possui início rápido, duração média e potência moderada (Schulman, 2009).

O encapsulamento da LC, faz com que ocorra a liberação controlada do fármaco no local da inoculação, prolongando o tempo de anestesia, sem a necessidade do uso de vasoconstritores, reduzindo a chance de toxicidade sistêmica devido a liberação sustentada do fármaco (Ribeiro *et al.*, 2018).

A indometacina (IC), um fármaco anti-inflamatório não esteroide (AINE) derivado do ácido indol acético, é prescrita para tratar uma variedade de doenças inflamatórias, incluindo artrite tendinite, sinovite traumática e espondilite anquilosante (SULEYMAN, Halis *et al.*, 2007). Sua eficácia decorre principalmente da capacidade de inibir a enzima ciclooxigenase, o que leva à diminuição da síntese de prostaglandinas, resultando na redução da resposta inflamatória (Sandoval, 2007).

Considerando que a administração oral da IC está relacionada a efeitos adversos significativos no sistema gastrointestinal, torna-se interessante testar novas estratégias para

mitigar a toxicidade sistêmica associada a este fármaco e aprimorar sua eficácia terapêutica. A nanoformulação de IC formada por uma mistura de lipídios sólidos e líquidos à temperatura ambiente, juntamente com um surfactante, demonstraram eficácia na liberação sustentada de medicamentos encapsulados (Ribeiro *et al.*, 2017).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi a realização do teste de toxicidade da LC, da IC comercial (LC e IC) e suas nanoformulações (LN e IN) em embriões de galinha como modelo animal em quatro diferentes vias de inoculação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Teste de toxicidade

Os testes de toxicidade são essenciais para proteger a saúde animal, humana e ambiental, pois garantem que substâncias químicas sejam utilizadas de forma segura e responsável assegurando a qualidade de vida e o bem-estar da sociedade. A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de certas substâncias causarem danos à saúde, além de classificar e rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou nocividade como estabelecido pela legislação. Assim como a letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda, como a identificação do potencial tóxico em órgãos específicos, identificação da toxicocinética e a relação-dose resposta, indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica, diagnóstico e tratamento das reações tóxicas, estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade, informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe, informações sobre quais seriam as consequências de exposições acidentais no trabalho ou no ambiente doméstico além de ser um padrão para a avaliação de testes alternativos ao uso de animais experimentais (Valadares, 2006).

Os métodos empregados para a condução deste teste são baseados em vários princípios. Primeiramente, adota-se uma abordagem de fixação de dose, em que animais do mesmo sexo são distribuídos em grupos e submetidos a doses pré-determinadas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg do fármaco. Neste procedimento, as doses são administradas em ordem decrescente até que uma concentração seja alcançada de forma que não provoque efeitos severos ou morte dos animais (Oecd, 2001a). O teste de classe tóxica aguda, por sua vez, envolve a utilização de 3 animais do mesmo sexo em cada etapa, nos quais são aplicadas doses fixas do medicamento para avaliar seus efeitos e a mortalidade. Posteriormente, a dose é ajustada, aumentando ou diminuindo, até que todos os animais apresentem sintomas ou morte, ou até que não apresentem sintomas (Oecd, 2001b). No procedimento *up and down*, o teste é realizado em um animal com uma determinada dose. Se o animal vier a óbito o próximo animal recebe uma dose menor com o fator de divisão de 3,2. Se o animal sobreviver, a próxima dose é multiplicada por 3,2 e assim se delimita a dose letal (Oecd, 2008).

Tabela 1. Princípios dos 3 métodos de avaliação de toxicidade aguda oral: adaptado do artigo de autoria de BOTHAM, 2004.

	Dose fixa	Classe tóxica	“Up and Down”
Nível da dose	Dose fixa de 5, 50, 300, 2000mg/kg, grupo de 5 animais por dose	Dose fixa de 5, 50, 300, 2000mg/kg, grupo de 3 animais por dose	Dose inicial estimada (175mg/kg), fator de progressão de 3.2, 1 animal
Princípio	Encontrar a quantidade mínima que resulte em toxicidade evidente	Encontrar a menor dose que cause mortalidade	Estimar a DL50
Dados Obtidos	Faixa estimada da DL50, sinais de toxicidade aguda. Órgão alvo	Faixa estimada da DL50, sinais de toxicidade aguda. Órgão alvo	Estimar a DL50, sinais de toxicidade aguda. Órgão alvo

2.2 Embriões de galinha como modelo animal alternativo

A utilização de animais em pesquisas é de suma importância para compreensão dos processos biológicos que ocorrem no organismo como um todo, fato que não é obtido em outros métodos (Heywood, 1987; Ribeiro *et al.*, 1995; Salén, 1995; Snitkoff, 2004). É importante destacar que os camundongos são os vertebrados mais utilizados em pesquisas científicas (Chorilli *et al.*, 2007). Nesse aspecto, vale ressaltar que vários cuidados são necessários visando o bem-estar desses mamíferos, como: temperatura, luz, ventilação, umidade, ruído e qualidade do ar extremamente controlados (Andrade, 2006). Em geral, os camundongos devem dispor de uma área mínima de 65 cm² por indivíduo quando agrupados e o piso de sua gaiola deve ser recoberto por material apropriado (Andrade, 2006).

O embrião de galinha (EG) é um modelo economicamente atrativo, devido seu baixo custo de manutenção, pois é um modelo autossuficiente e seu desenvolvimento natural ocorre a 37°C e 60% de umidade sem a necessidade de meios de sustentação mais complexos (Kain *et al.*, 2012). Outro fator importante é que dentro de uma única incubadora, detemos um grande número de EG sem a necessidade de ocupação de grande área de espaço.

Além disso, dentro do ovo, o embrião é um modelo altamente controlado, acessível e relativamente transparente no qual a fisiologia normal, a patologia da doença e as consequências da manipulação experimental podem ser facilmente visualizadas permitindo alta reprodutibilidade e experimentos simplificados e econômicos (Kain *et al.*, 2012). Além da facilidade de manuseio, também se destaca a maior aceitação em comitês de ética, pois as leis nacionais não categorizam os embriões de aves como seres vivos de acordo com suas regulamentações, contudo, sabe-se que o período em que o embrião começa a sentir dor não é exatamente determinado. O NHI (Comitê Consultivo de Pesquisa Animal para a eutanásia), dita que o desenvolvimento de nocicepção ocorre semelhante a mamíferos, e que 72h antes da eclosão o tubo neural está totalmente formado, exigindo o bom manuseio e técnicas adequadas empregadas em estudos visando manter o bem-estar dos EG (American Veterinary Medical Association, 2021).

O desenvolvimento do EG é concluído em 21 dias, sendo o mais rápido entre os modelos animais mais utilizados e igual apenas do embrião de camundongo. Assim, em cada dia de idade de incubação, muitas alterações fisiológicas podem influenciar significativamente os estudos e as respostas que estão sendo avaliadas. No primeiro dia de desenvolvimento, os vasos sanguíneos extraembrionários ficam visíveis no saco vitelínico por volta de 23-24 horas após o início da incubação. Os batimentos cardíacos podem ser identificados entre 33-38 horas após o início da incubação, com a circulação sanguínea ocorrendo por volta de 51-56 horas de incubação. O alantoide se desenvolve em 3 dias de incubação (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 permite o início de uma série de testes a partir do 7 DDI (Hamburger e Hamilton, 1992, Sheng 2010).

Em suma, a aplicação do medicamento em quatro locais diferentes do ovo ou embrião pode ser usada como uma representação ou simulação de como o medicamento se comportaria quando aplicado em diferentes locais em animais após o nascimento. As principais vias de inoculação são através da gema, membrana corioalantoide (CAM), alantoide (AL), membrana da casca (MC), amnio (AM) e saco vitelínico (Ribeiro *et al.*, 2022).

Vários parâmetros do EG podem ser estudados e comparados nos exames de toxicidade, como a mortalidade embrionária, peso dos ovos, embriões e anexos, estresse oxidativo, marcadores bioquímicos séricos, bioquímica do líquido alantoide e amniótico, morfologia dos glóbulos vermelhos, danos a órgãos e embriões malformados (Gebhardt, *et al.*, 1968, Hrubá,

H. *et al* 2019, Korhonen, A. *et al.*, 1982, Sadighara, P. *et al.*, 2011, Elsayed, M. *et al.*, 2019, Ribeiro *et al.*, 2020).

Os órgãos afetados podem ser estudados e analisados bioquimicamente, ou pelo uso de técnicas de microscopia eletrônica (Ribeiro *et al.*, 2022). Considerando os parâmetros que podem ser observados, é possível mensurar a gravidade e os potenciais danos que podem ocorrer nos embriões em determinada dose.

2.3 Lidocaína

Anestésico local é uma substância que, quando aplicada em uma determinada região, é capaz de impedir temporariamente a transmissão de impulsos nervosos no local, sem afetar o estado de consciência do indivíduo. A LC é utilizada em procedimentos de anestesia local, bloqueios de nervos periféricos, bem como em anestésias peridural, espinhal e tópica. Além disso, é utilizada como um medicamento antiarrítmico da classe I. É válido ressaltar que a lidocaína é considerada uma opção relativamente acessível quando comparada a outros anestésicos locais. Seu mecanismo de ação consiste na ligação do fármaco aos canais iônicos seletivos de sódio nas fibras nervosas, inibindo a permeabilidade ao sódio, impedindo a despolarização e a condução do potencial elétrico (Schulman, 2009).

A LC é um medicamento com uma ligação amida e uma hidrofobicidade moderada. A ligação amida evita a quebra dos medicamentos pelas enzimas esterases, ao passo que a hidrofobicidade permite que ele permaneça na região de administração por um período prolongado. Desta forma, possui início de ação rápido e uma duração média de efeito, com uma potência moderada. Sua estrutura inclui dois grupos metila no anel aromático, os quais aumentam sua hidrofobicidade e desacelera seu processo de hidrólise. Esse composto possui o pKa relativamente baixo e, em um pH fisiológico, a maior parte do medicamento está em sua forma neutra, essa característica permite que ele se difunda rapidamente por meio das membranas e cause um bloqueio rápido (Schulman, 2009).

A LC passa por processos metabólicos no fígado, onde, inicialmente, o grupo alquila ligado ao nitrogênio terciário é removido devido à ação das enzimas do citocromo P450. Em seguida, ela é submetida a processos de hidrólise e hidroxilação. Vale mencionar que os metabólitos resultantes da lidocaína têm uma atividade anestésica bastante reduzida (Schulman, 2009).

Os efeitos tóxicos da LC são predominantemente observados no sistema nervoso central (SNC) e no coração. Os efeitos adversos podem envolver zumbidos nos ouvidos,

tremores musculares e, em casos extremos, convulsões e morte. A depressão do SNC e a toxicidade cardíaca podem ocorrer quando os níveis de LC no sangue estão elevados (Schulman, 2009).

2.4 Nanoformulação de Lidocaína

O marco inicial da nanotecnologia ocorreu durante a palestra proferida por Richard Feynman em 1959, na qual ele sugeriu a ideia de manipular átomos e destacou que os seres humanos não estavam limitados a aceitar os materiais da maneira como a natureza os oferece, desde que não violassem como leis naturais (Cadioli, 2006). A nanotecnologia é um campo científico que, de forma ampla, se concentra na pesquisa, criação e análise de sistemas em dimensões extremamente pequenas, em escala nanométrica (Kawasaki, 2005). Essa tecnologia busca a inovação de materiais e a concepção de novos produtos e métodos, aproveitando a capacidade crescente da tecnologia contemporânea para observar e controlar átomos e moléculas. Em níveis nanométricos, os átomos exibem propriedades únicas, como resistência à temperatura, variações de cor, reatividade química e condutividade elétrica distintas (Galembeck, 2004).

Uma característica distintiva dos materiais com nanoestrutura reside em sua capacidade de ampliar as propriedades físicas e químicas dos materiais, o que desperta um interesse específico e relevância crescente para futuras aplicações tecnológicas, como os nanofármacos que representam uma inovação no campo da administração de medicamentos, visto que fornece novos mecanismos para sua administração (Silva, 2016).

A LC com carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC), como a segunda geração das nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), surgiram como opção proeminente para resolver limitações recorrentes de outros sistemas de liberação de fármacos (SLF), devido à sua capacidade de encapsular moléculas hidrofóbicas com alta eficiência (Müller *et al.*, 2011). As formulações exibiram excelentes propriedades estruturais e estabilidade, capazes de carregar grandes quantidades do anestésico com perfil de liberação sustentada, provaram ser atóxicos *in vitro* e melhoraram significativamente os efeitos *in vivo*. As formulações de NLC foram compostas por óleo de copaíba e cera de abelha, óleo de amêndoa doce e manteiga de karité, e óleo de gergelim e manteiga de cacau como matriz lipídica, preparada pelo método de emulsificação-ultrassonicação encapsularam eficientemente (79-86%) a LC. As formulações lipídicas não afetaram a viabilidade celular e reduziram significativamente a citotoxicidade intrínseca do fármaco. Os ensaios *in vivo* foram realizados utilizando larvas de peixe-zebra e

camundongos (teste de pressão da pata). Em ambos os casos, o efeito terapêutico do NLC foi aumentado pelo encapsulamento. Sendo assim, é possível obter uma aplicação versátil com lipídios naturais aproveitando sua diversidade, baixo custo e abundância (Ribeiro *et al.*, 2017).

2.5 Indometacina

Lesões como traumas, infecções e ação de anticorpos desencadeiam uma resposta inflamatória. Esse processo pode ser descrito em três estágios diferentes, na fase aguda, observa-se uma dilatação dos vasos sanguíneos locais e um aumento na permeabilidade capilar; durante uma fase subaguda, há uma migração de leucócitos e células fagocitárias para a área afetada, sendo a fase crônica, proliferativa marcada pela degeneração do tecido (Leonardo *et al.*, 2009).

A IM é da classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e suas ações derivam principalmente da sua capacidade de inibir a enzima ciclo oxigenase (COX), resultando na redução da produção de prostaglandinas e na atenuação da resposta inflamatória. Geralmente, os AINEs também agem como antagonistas dos receptores de prostaglandinas, o que resulta na redução da permeabilidade capilar, diminuindo assim o edema e a vermelhidão. Além disso, esses medicamentos inibem a liberação de prostaglandina E1, o que contribui para a redução da febre (Sandoval, 2007).

A IM é amplamente utilizada devido às suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas. É indicada para tratamento de várias condições inflamatórias, incluindo artrite reumatoide, osteoartrite, artrite intestinal, bursite, tendinite, sinovite traumática e espondilite anquilosante (Suleyman, halis, *et al.*, 2007).

Além dos efeitos benéficos desse medicamento, também são descritos alguns efeitos adversos como cefaleia, tonturas, depressão, vertigem e fadiga (incluindo mal-estar e dispersão) e, uma das principais restrições associadas ao uso dos AINES reside nos seus impactos no trato gastrointestinal, os quais se contam entre os mais sérios e podem incluir sintomas como náusea, falta de apetite, vômito, sensação de desconforto na região epigástrica, dor abdominal, constipação e diarreia (Rama *et al.*, 2006). O efeito tóxico mais frequente da IM é a ocorrência de danos no trato gastrointestinal (TGI). Esses efeitos podem variar desde perda de sangue desconhecida até perfuração de úlcera (Wallace, John I, *et al.*, 1997).

2.6 Nanoformulação de Indometacina

A administração oral da IM causa sérios efeitos colaterais gastrointestinais, como náusea, anorexia, vômito, desconforto epigástrico, dor abdominal, constipação e diarreia devido seu metabolismo de primeira passagem, que são intensificados em condições inflamatórias crônicas onde o tratamento contínuo com esse medicamento é imprescindível (Bonetti *et al.*, 2022).

Dado que os AINES são amplamente prescritos em todo o mundo, facilmente acessíveis e empregados para tratar uma variedade de enfermidades, é crucial adotar novas abordagens para reduzir a toxicidade sistêmica da IM e aprimorar sua eficácia, diminuindo os efeitos adversos existentes. O desenvolvimento de sistemas de entrega híbridos associa os benefícios de diferentes nanotransportadores em um único sistema, projetado para melhorar a eficácia e/ou minimizar a toxicidade das drogas (Bonetti *et al.*, 2022).

Esta nanoformulação consiste em nanocarreadores lipídicos estruturados contendo IM (NLC/IM; 2%) e quitosana (CHT; 2%), os quais são revestidos por xantana (XAN; 0,5%). Esses sistemas demonstram propriedades estruturais e termodinâmicas excelentes, bem como um perfil de liberação do fármaco prolongado *in vitro* por até 26 horas. A interação sinérgica entre os excipientes nanolipídicos e os biopolímeros impede a liberação explosiva do fármaco nas primeiras 2 horas, simulando as condições gástricas, seguidas por uma liberação prolongada em pH 6,8, que imita o ambiente intestinal. O revestimento de xantana nas nanoesferas (XAN/CHT/NLC-IM) atua como um agente gastro-resistente, protegendo o NLC/IM e a CHT de um inchaço súbito e da subsequente liberação total do fármaco nas primeiras horas do experimento (Bonetti *et al.*, 2022).

O ensaio de toxicidade *in vivo* em EG confirmou a segurança das nanoesferas, que combinou as vantagens da hibridização e procedimentos de revestimento, diminuindo a toxicidade intrínseca da IM no EG em todos os parâmetros analisados. No geral, a nanopérola de biopolímero lipídica proposta é uma excelente candidata para administração de IM, bem como outros antiinflamatórios por via oral (Bonetti *et al.*, 2022).

3. METODOLOGIA

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

Foram testadas quatro vias de inoculação, sendo elas MC, CAM, AM e AL e quatro fármacos, a LC e sua nanoformulação (LN) as quais foram utilizadas em 5 diferentes concentrações: 3mg/embrião, 1,5mg/embrião, 0,75mg/embrião, 0,38mg/embrião e 0,19mg/embrião; e a IC e sua formulação (IN) nas seguintes concentrações: 4mg/embrião, 2mg/embrião, 1mg/embrião, 0,5mg/embrião e 0,25mg/embrião.



Figura 1. Esquema das quatro vias de inoculação, sendo, A: Membrana da casca, B:Âmnio, C:Alantoide, E: Membrana corioalantóide (Manders, TTM *et al.* (2020).

Foram utilizados um total de 572 EG com 11 DDI e cada grupo foi composto por 6 EG a exceção da via âmnio em que havia 8 embriões. Além disso, foram incluídos controles negativos, nos quais nenhum fármaco ou nanoformulação estava presente.

Os ovos foram primeiramente submetidos a ovoscopia, para confirmar o sucesso do desenvolvimento embrionário. Para inoculação na MC, foi realizada uma pequena perfuração acima da câmara de ar (CA), seguido pela aplicação utilizando uma agulha de injeção (Gebhardt e Van Logten, 1968). No caso da CAM, foi criada uma abertura na parte superior do ovo e, com

extrema precaução, uma pequena parte da membrana da casca foi removida, deixando a CAM exposta e pronta para administração (Zhu *et al.*, 2014). Para a administração no AM, foi realizado um orifício central em direção ao embrião e o inóculo foi administrado com uma agulha hipodérmica 21G com cuidado para evitar perfurá-lo. Por fim, para AL, foi realizada uma perfuração na transição entre a câmara de ar e o alantoide, seguida pela inserção perpendicular da agulha para efetuar a aplicação (Vaezirad *et al.*, 2018).

Os ovos foram então incubados e monitorados regularmente para verificar a mortalidade e realizar o embriodiagnóstico.

Para a análise de mortalidade em cada dose do fármaco, foi realizado uma análise quantitativa utilizando a porcentagem entre o total mortes sobre a quantidade de EG por grupo dentro de via testada. Para comparar a mortalidade da nanorformulação e do fármaco comercial para todas as doses ou a interferência da via sobre a mortalidade foi realizada teste do quiquadrado seguido pelo binomial entre duas proporções considerando o $p < 0,05$. Foi usado o programa GraphPad PRism 9.2 para as análises.

4. RESULTADOS

Ao considerar uma dose de 3mg/EG, o uso da LC resultou em uma taxa de mortalidade de 16,66% (1/6) exclusivamente na via MC, enquanto nos outros locais de inoculação não foram registradas mortes. Da mesma forma, o uso de LN na mesma dose resultou em uma taxa de mortalidade de 16,66% (1/6) nas vias CAM e AL, enquanto não houve mortalidade nas demais. Para a dose de 1,5mg/EG, observou-se uma taxa de mortalidade de 16,66% (1/6) na via CAM e 12,5% (1/8) na via AM com o uso de LC, enquanto as outras vias não registraram mortalidade. Em contraste, o uso de LN na mesma dose não resultou em mortes em nenhuma das vias. Na dose de 0,75mg/EG, o uso de LC resultou em uma taxa de mortalidade de 33,3% (2/6) na via CAM e 12,5% (1/8) na via AM. Já a utilização de LN nessa mesma dose ocasionou uma mortalidade de 12,5% (1/8) na via AM, sem registros de mortes nas demais vias. Utilizando 0,38mg/EG, não foram registradas mortes com o uso de ambas as formulações. Entretanto, com a dose de 0,19mg/EG, ocorreu uma taxa de mortalidade de 16,66% (1/6) apenas para LC na via CAM e de 12,5% (1/8) para LN na via AM (Figura 1).

Figura 1. Percentual de mortalidade dos EG inoculados com LC e LN em diferentes doses

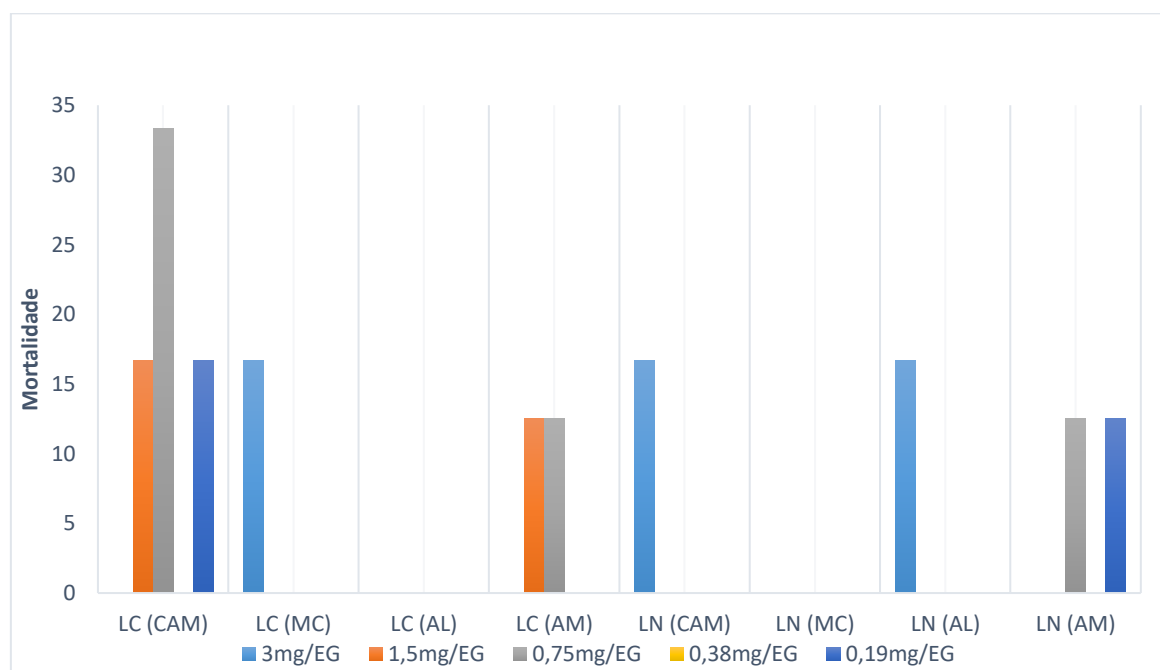


Figura 2. Percentual de mortalidade dos embriões inoculados com Lidocaína comercial (LC) e Lidocaína nanoformulada (LN) em quatro diferentes doses (3mg/EG, 1,5mg/EG, 0,75mg/EG, 0,38mg/EG e 0,19mg/EG), pelas vias membrana da casca (MC), membrana corioalantoide (CAM), alantoide (AL) e âmnio (AM). EG: Embrião de Galinha.

Na dose de 4mg/EG utilizando a IC houve a mortalidade 37,5% (3/8) no AM enquanto não ocorreu mortes nas outras vias. Com a IN houve morte de 16,66% (1/6) na CAM e 62,5% (5/8) na via AM, com ausência de morte nas outras vias. Utilizando 2mg/EG, com a IC, houve mortalidade de 33,33% (2/6) na CAM e 16,66% (1/6) na via AL, com ausência de morte nas outras vias. A IN apresentou 16,66% (1/6) na CAM, 33,33% (2/6) no AL e 12,5% (1/8) no (AM). Na dose 1mg/EG, com a IC houve mortalidade de 33,33% (2/6) na (CAM) e 12,5% (1/8) no AM. Com a IN ocorreu 50% (3/6) de morte na via AL e 37,5% (3/8) no AM. Na dose 0,5mg/EG, com a IC houve mortalidade apenas no AM de 12,5% (1/8). Utilizando a IN houve a mortalidade de 33,33% (2/6) na CAM, 16,66% (1/6) no AL e 62,5% (5/8) no AM. Por fim, na dosagem de 0,25mg/EG utilizando a IC houve morte apenas no AM de 12,5% (1/8). Com a IN houve mortalidade de 16,66% (1/6) no AL e 62,5% (5/8) no AM (Figura 2).

Figura 2. Percentual de mortalidade dos EG inoculados com IC e IN

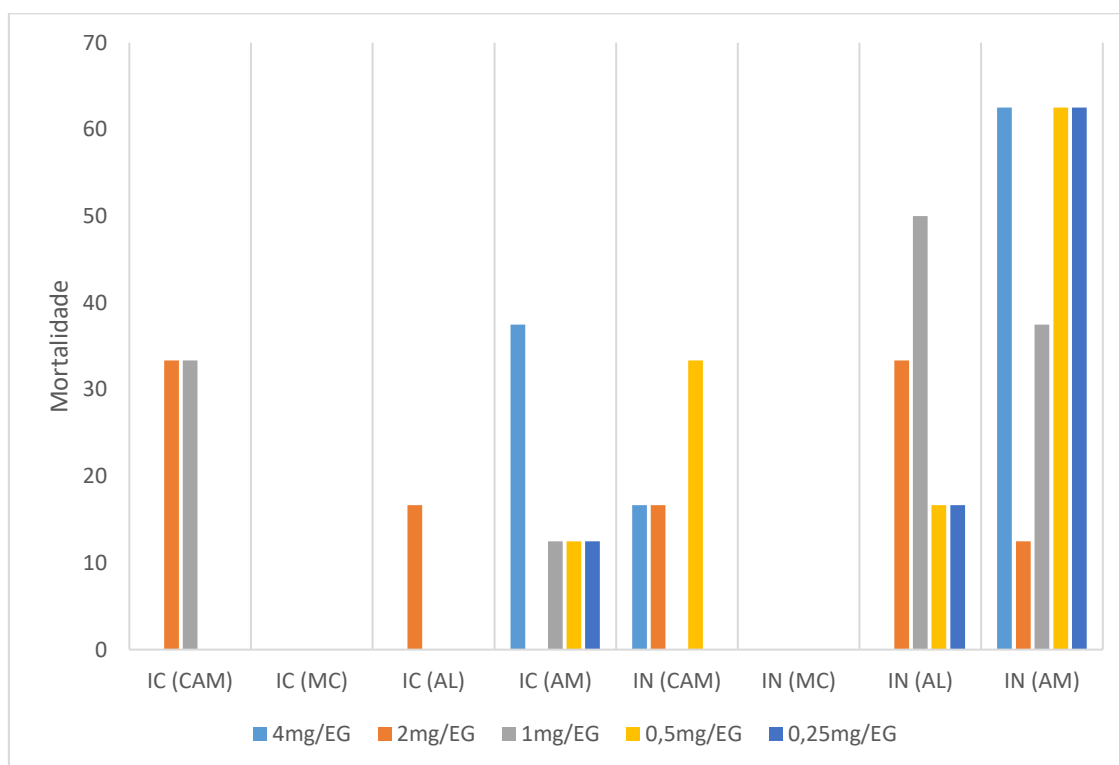
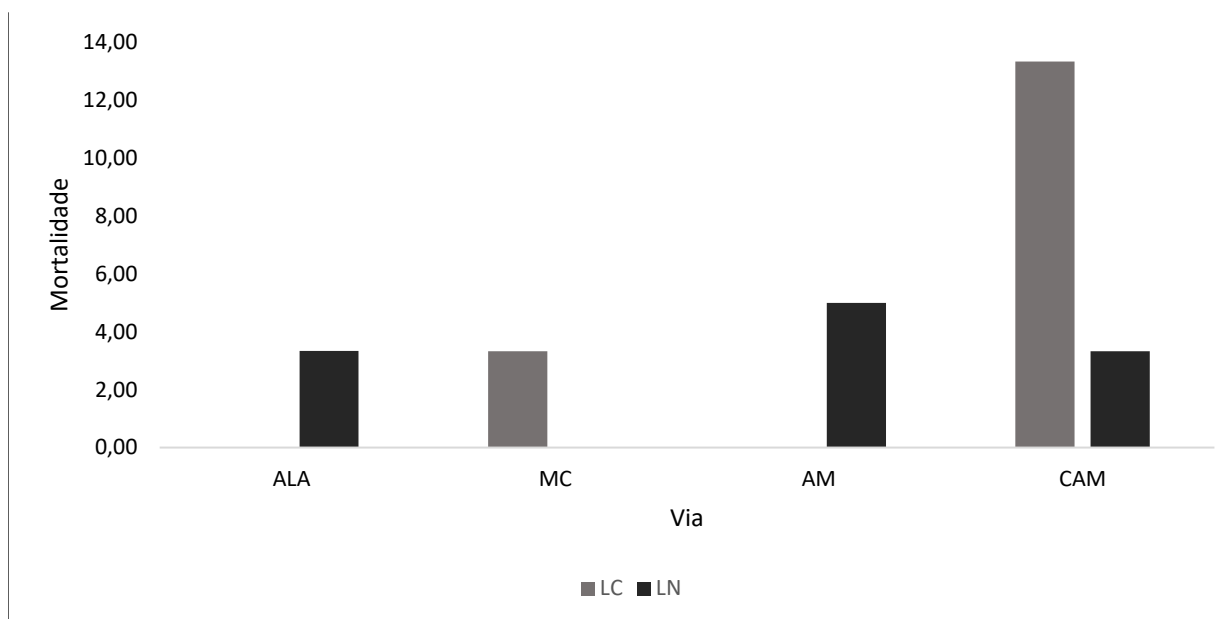


Figura 3. Percentual de mortalidade dos embriões inoculados com Indometacina comercial (IC) e Indometacina nanoformulada (IN) em quatro diferentes doses (4mg/EG, 2mg/EG, 1mg/EG, 0,5mg/EG e 0,25mg/EG), pelas vias membrana da casca (MC), membrana corioalantoide (CAM), alantoide (AL) e âmnio (AM). EG: Embrião de Galinha.

Ao conduzir as avaliações abrangendo todas as doses, não houve diferença estatística entre as mortalidades da Lidocaína comercial e a Nanoformulação. (Figura 3).

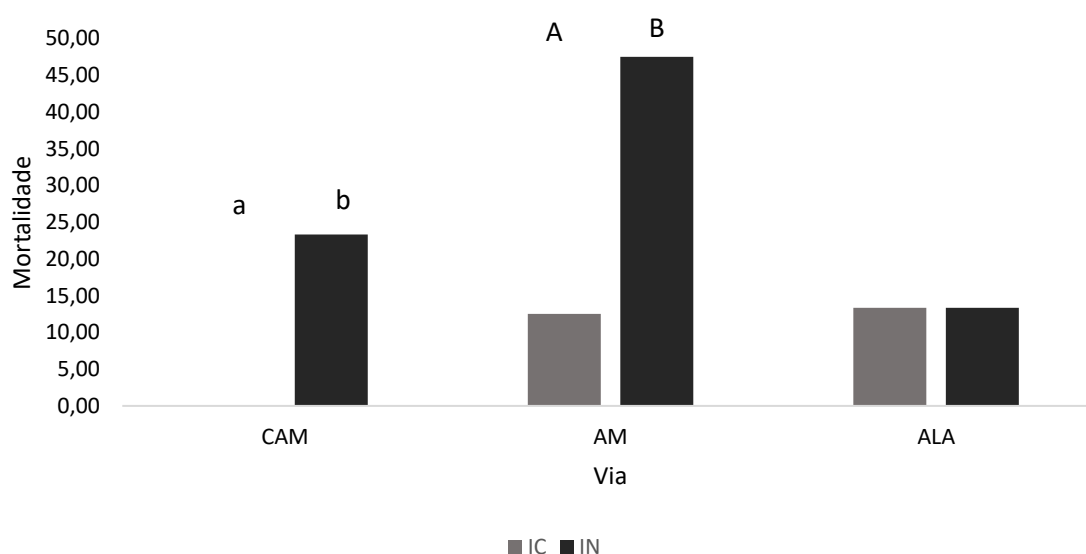
Figura 3. Comparação entre a mortalidade dos embriões inoculados com a LC e LN em diferentes vias



Alantoide (AL), membrana da casca (MC), âmnio (AM) e membrana corioalantóide (CAM) em diferentes doses. Lidocaína comercial (LC), Lidocaína nanoformulada (LN). Foi realizado o teste quiquadrado seguido pelo binômial entre duas proporções comparando a via e por tipo de fármaco (comercial e nanoformulado). Letras diferentes na mesma via e fármaco indica diferença estatística.

Ao realizar as análises estatísticas considerando todas as doses IN apresentou maior mortalidade para as vias CAM e AM. Para as vias AL e MC não houve diferença na mortalidade.

Figura 4. Percentual de mortalidade de embriões inoculados com indometacina comercial e nanoformulada em diferentes vias.



Alantoide (AL), membrana da casca (MC), âmnio (AM) e membrana corioalantóide (CAM) em diferentes doses. Lidocaína comercial (LC), Lidocaína nanoformulada (LN). Foi realizado o teste quiquadrado seguido pelo binômial entre duas proporções, por via e por tipo de fármaco (comercial e nanoformulado). Letras diferentes na mesma via e fármaco indica diferença estatística.

Também foi realizada a comparação entre vias considerando todas as doses para cada fármaco (comercial ou nanoformulado). Não houve diferença de mortalidade entre vias para LC e LN. Para indometacina comercial não houve diferença de mortalidade entre as vias, mas para indometacina nanoformulada a via do AM resultou em mortalidade maior que todas as outras vias ($p < 0,0001$). A IN pela via CAM causou mais mortalidade que as outras vias a exceção da via AM.

5. DISCUSSÃO

A Lidocaína pertence à categoria dos anestésicos locais do grupo amida, os quais, em comparação com os anestésicos locais do tipo éster, costumam ser bem tolerados, com poucas ocorrências de reações alérgicas. Mesmo com as diversas vias de administração, injeção, inalação ou aplicação tópica como agente anestésico, a LC demonstra uma ampla margem de segurança antes de atingir níveis sanguíneos considerados tóxicos (Torp, Klaus D, *et al* 2018). Na espécie de galinhas, a dose convulsiva de lidocaína foi de $\pm 5,15$ mg/kg, sendo esta a mais elevada entre todas as espécies estudadas (Imani, Hadi; *et al* 2013). Essa disparidade pode ser atribuída às distintas estruturas anatômicas e funções fisiológicas do cérebro das galinhas (Stewart PA, *et al* 1981). Portanto, a baixa ocorrência de mortes mesmo em doses altas encontrada nesse estudo, evidencia a segurança deste medicamento. Além disso, sua nanoformulação revelou uma taxa de mortalidade similar à da LC (Figura 3), sugerindo que a LN pode ser ainda mais segura do que a LC já que as nanoformulações são utilizadas em dosagem menor para que a mesma ação ocorra em um tecido.

A nanotecnologia farmacêutica desperta particular interesse devido à capacidade de manipular estruturas em dimensões nanométricas, conferindo-lhes propriedades distintas não encontradas em escalas maiores. Essas propriedades incluem um contato mais efetivo da área interfacial com os tecidos biológicos e um aumento significativo da biodisponibilidade. Tal característica permite a redução da dose necessária de medicamentos, impulsionando assim o crescimento exponencial da adoção desses sistemas de nanoengenharia (Tibbitt *et al.*, 2016). Nesse trabalho não foi encontrado o valor de LD50 já que as doses aplicadas não levaram alta mortalidade dos embriões. Porém, a comparação entre a formulação da IC e a da IN revelou uma taxa de mortalidade mais elevada na última. Essa observação levanta a possibilidade de que o aumento da biodisponibilidade da IN possa estar relacionado a essa taxa de mortalidade. Sabendo que a ausência de exposição implica ausência de toxicidade, é nítido que se houver exposição, a toxicidade pode ocorrer quando essa exposição ultrapassa uma dose e/ou tempo específicos. Isso dependerá das interações entre a toxicocinética (como o organismo absorve, distribui, metaboliza e excreta a substância) e a toxicodinâmica (como a substância afeta o organismo em nível molecular e celular) (Rozman, Karl K *et al.*, 2000). Dessa forma, ao relacionar a maior taxa de mortalidade observada com a administração da IN com a dose, é possível inferir que, comparativamente, pode se alcançar os efeitos terapêuticos desejados com uma dose menor, distanciando de uma dose potencialmente tóxica. Isso sugere que a IN pode

ser mais eficiente e segura em termos de toxicidade, permitindo uma redução na quantidade de medicamento necessária para alcançar os efeitos terapêuticos desejados. Fármacos aprimorados por nanobiotecnologia demonstram ser mais potentes e possuem uma meia-vida prolongada (Ribeiro *et al.*, 2020). Esse fenômeno ressalta a eficácia e o potencial de otimização terapêutica proporcionados pela nanobiotecnologia na entrega de medicamentos.

A membrana corioalantóide (CAM) é um tecido altamente vascularizado que atua como o sistema respiratório inicial do embrião de galinha, contendo uma abundância de fatores de crescimento e oxigênio (Schneider-Stock *et al.*, 2021). Originalmente, o modelo CAM foi desenvolvido para pesquisas teratológicas (Goerttler 1962). Também é amplamente utilizado para simulação de administração parenteral ou tópica (Ribeiro *et al.*, 2022). Considerando todas as doses a CAM levou a maior mortalidade para LC. Essa diferença pode estar relacionada ao fato de que a CAM apresenta uma extensa rede vascular com artérias, capilares e veias e uma notável neovascularização (Schneider-Stock *et al.*, 2021). Dessa forma, a abundância de vasos pode estar relacionada a melhor entrega e biodisponibilidade dos fármacos, pois uma absorção mais significativa dos fármacos pode ter exposto os embriões a um risco maior de lesão.

A película localizada entre a casca calcificada e a clara dos ovos, é conhecida como membrana da casca do ovo, é uma fina e altamente colagenizada membrana fibrosa. Ela consiste em camadas internas (em contato com a clara) e externas, predominantemente compostas pelos tipos I, V e X de colágeno. (Leach jr *et al.*, 1986). As camadas interna e externa possuem poros com tamanhos de 126 Å (ou 12,6 nm) e 0,53 µm, respectivamente (Kutchai *et al.*, 1971). Como observado, a MC apresentou uma mortalidade baixa em ambos os fármacos, esse baixo índice observado, sugere a hipótese de que a droga pode não ter atravessado efetivamente ou apenas de forma limitada a membrana, visto que a estrutura das formulações são de aproximadamente 250nm.

No terceiro dia de desenvolvimento embrionário, o alantoide surge devido à evaginação da parede ventral do intestino posterior. Essa estrutura funciona como um reservatório para os resíduos excretados pelo embrião (Ribatti, D. 2017). O saco alantóico é uma prolongação do intestino do embrião que tem a capacidade de absorver nutrientes (Tagliatti, Vanessa *et al.*, 2023). Como visto, a via AL demonstrou uma taxa de mortalidade baixa em embriões inoculados com IN comparada com AM e CAM, apesar da sua considerável capacidade de absorção. O líquido alantóideo também atua como um reservatório para elementos essenciais utilizados durante os estágios finais do desenvolvimento embrionário (Da Silva, M *et al.*, 2017). A baixa mortalidade no AL em relação a AM e CAM da IN pode ter ocorrido pela diluição do

fármaco no líquido já que a quantidade de líquido no alantoide é alta em relação aos outros anexos ou pela presença de metabólitos no fluido que interferem com a absorção dos fármacos.

Durante o desenvolvimento, o âmnio envolve o embrião, e sua camada celular interna produz o líquido amniótico, o qual protege o embrião de impactos mecânicos e variações térmicas, além de prevenir a desidratação. Próximo à eclosão (por volta do décimo sétimo dia de incubação), o embrião começa a ingerir o líquido amniótico como fonte de água e nutrientes (Jean Eduardo *et al.*, 2008). Foi observado que nessa via, a IN levou maior número de óbitos quando comparada a sua formulação comercial, sendo possível relacionar a boa absorção do trato gastrointestinal desse medicamento.

6. CONCLUSÃO

A utilização de embriões de galinhas como modelo experimental se mostrou uma experiência positiva. A praticidade de manuseio, o baixo custo e o rápido desenvolvimento desse método, aliados à transparência que facilitam a observação, sugerem um modelo de pesquisa controlado, eficiente e acessível.

Os resultados indicaram que a nanoformulação de lidocaína apresentou uma taxa de mortalidade comparável à lidocaína comercial, sugerindo que a nanoformulação pode ser potencialmente mais segura, já que as nanoformulações geralmente são administradas em doses menores para obter o mesmo efeito nos tecidos. Por outro lado, a nanoformulação de indometacina mostrou uma taxa de mortalidade superior à indometacina comercial, o que sugere que uma dose menor é capaz de produzir o mesmo efeito que uma dose usual da indometacina comercial. As vias CAM e AM levam uma maior mortalidade em embriões inoculados com IN provavelmente devido a maior absorção das drogas.

7. REFERÊNCIAS

American Veterinary Medical Association. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. (American Veterinary Medical Association, Schaumburg, IL, 2020)

Bonetti, Flávia Monique Rocha et al. Nanopérolas híbridas para administração oral de indometacina. *Farmacêutica*, v. 14, n. 3, pág. 583, 2022.

Cadioli, Luiz Paulo; Salla, Luzia Dizulina. Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia. *Revista de Ciências exatas e tecnologia*, v. 1, n. 1, p. 98-105, 2006.

Chorilli, Marlus; Michelin, Daniel C.; Salgado, Hérica Regina Nunes. Animais de laboratório: o camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n. 1, 2007.

Da Silva, M.; Labas, V.; Nys, Y.; Rehault-Godbert, S. Investigando proteínas e proteases que compõem os fluidos amnióticos e alantóides durante o desenvolvimento embrionário da galinha. *Poult. Ciência*. 2017, 96, 2931–2941.

De Almeida, Ana Cláudia Pedreira et al. Formulação de lidocaína à base de lipossomas para a melhoria da anestesia bucal infiltrativa. *Revista de pesquisa de lipossomas*, v. 29, n. 1, pág. 66-72, 2019.

De Oliveira, Jean Eduardo et al. Efeitos da alimentação in ovo no desenvolvimento de embriões de peru, status energético, maturação intestinal, expressão gênica e desenvolvimento pós-eclosão. 2008.

ElSayed, M., Mohamed, N., Hatab, M. & Elaroussi, M. *Brazilian J. Poult. Sci.* 21, (2019).

FeYNMAN, Richard P. Há muito espaço na parte inferior. *Engenharia e ciência*, v. 23, n. 5, 1959.

Fonseca, Belchiolina Beatriz; Da Silva, Murilo Vieira; De Moraes Ribeiro, Ligia Nunes. The chicken embryo as an in vivo experimental model for drug testing: Advantages and limitations. *Lab Animal*, v. 50, n. 6, p. 138-139, 2021.

Gebhardt, D. O. E. & Van Logten, M. J. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 13, 316–324 (1968).

Goerttler K (1962) The “teratological basic experiment” on the incubated chick embryo, its possibilities and limitations. *Klin Wochenschr* 40:809–812.

Hamburger, Viktor; Hamilton, Howard L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental dynamics*, v. 195, n. 4, p. 231-272, 1992.

Hrubá, H. et al. *BMC Vet. Res.* 15, 209 (2019).

Imani, Hadi; Vesal, Nasser; Mohammadi-Samani, Soliman. Avaliação da overdose intravenosa de lidocaína em galinhas (*Gallus domesticus*). *Revista Iraniana de Cirurgia Veterinária* , v. 1, pág. 9-16, 2013.

Kain, K.H.; Miller, J.W.I.; Jones-Paris, C.R.; Thomason, R.T.; Lewis, J.D.; Bader, D.M.; Barnett, J.V.; Zijlstra, A. The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. *Dev. Dyn.* 2014, 243, 216–228.

Korchonen, A., Hemminki, K. & Vainio, H. *Scand. J. Work. Environ. Health* 8, 63–69 (1982).

Kutchai, Howard; Steen, Johan B. Permeabilidade da casca e membranas da casca de ovos de galinha durante o desenvolvimento. *Fisiologia da Respiração* , v. 11, n. 3, pág. 265-278, 1971.

Leach Jr, Roland M. Biochemistry of the organic matrix of the eggshell. *Poultry Science*, v. 61, n. 10, p. 2040-2047, 1982.

Lucas, Sílvia. A farmacologia da indometacina. Dor de cabeça: *The Journal of Head and Face Pain* , v. 2, pág. 436-446, 2016.

Moreira, José Ranclenisson Lopes. A nanotecnologia na liberação controlada de fármacos no tratamento do câncer de mama. 2013.

Muri, Estela Maris Freitas; De Mello Sposito, Maria Matilde; Metsavaht, Leonardo. Antiinflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local. *Acta fisiátrica*, v. 16, n. 4, p. 186-190, 2009.

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

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

OECD. Test Guideline 425: Acute Oral Toxicity - Up-and-Down Procedure (UDP); Organization for Economic Co-operation and Development Guideline for Testing of Chemicals, 2008.

Rama, Ana Cristina Ribeiro et al. Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil-beta-ciclodextrina: estudos de dissolução e coeficiente de partição. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 59-68, 2006.

Ribeiro, Lígia NM et al. NLC à base de lipídios naturais contendo lidocaína: da pré-formulação aos estudos in vivo. *Jornal Europeu de Ciências Farmacêuticas*, v. 102-112, 2017.

Ribeiro, Lígia Nunes de Moraes et al. Formulação híbrida de pectina-lipossoma contra cepas bacterianas multirresistentes. *Farmacêutica*, v. 12, n. 8, pág. 769, 2020.

Ribeiro, L. N. M. et al. Chicken embryo: a useful animal model for drug testing?. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, v. 26, n. 13, 2022.

Ribeiro, LNM et al. *Pharmaceutics* 12, 769 (2020).

Ribatti, D. O ensaio da membrana corioalantóica do embrião de galinha (CAM). *Reprodução. Toxicol.* 2017 , 70 , 97–101.

Sadighara, P., Amoli, J. S., Ashrafhelan, J., Aliesfahani, T. & Farkhondeh, T. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21, 560–563 (2011).

Sandoval, Alline Correia et al. O uso indiscriminado dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). 2017.

Schneider-Stock, Regine; Ribatti, Domenico. The CAM assay as an alternative in vivo model for drug testing. *Organotypic Models in Drug Development*, p. 303-323, 2021.

Schulman, Joshua M.; Strichartz, Gary R. *Farmacologia dos anestésicos locais. Princípios de Farmacologia—a base fisiopatológica da Farmacoterapia.* 2^a. Edição, 2009.

Silva, Núbia Rosa da. Reconhecimento de padrões heterogêneos e suas aplicações em biologia e nanotecnologia. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Sommerfeld, Simone et al. Alterações fisiológicas em embriões de galinha inoculados com drogas e vírus destacam a necessidade de maior padronização deste modelo animal. *Animais* , v. 12, n. 9, pág. 1156, 2022.

Stewart, P. A.; Wiley, M. J. Structural and histochemical features of the avian blood-brain barrier. *Journal of Comparative Neurology*, v. 202, n. 2, p. 157-167, 1981.

Suleyman, Halis; Demircan, Berna; Karagoz, Yalcin. Anti-inflammatory and side effects of cyclo-oxygenase inhibitors. *Pharmacological reports*, v. 59, n. 3, p. 247, 2007.

Tagliatti, Vanessa et al. Predição de lesão hepática induzida por valproato usando análise metabolômica de fluido alantóico de embrião de pintainho ex ovo. *Metabólitos* , v. 13, n. 6, pág. 721, 2023.

Tibbitt, M.W., Dahlman, J.E., Langer, R., 2016. Emerging frontiers in drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 704–717.

Torp, Klaus D.; Metheny, Eric; Simon, Leslie V. Toxicidade da lidocaína. 2018.

Vaezirad, M. M. et al. Chicken immune response following in ovo delivery of bacterial flagellin. *Vaccine*, v. 36, n. 16, p. 2139-2146, 2018.

Valadares, Marize C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50 “. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, n. 2, 2006.

Wallace, John L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. *Gastroenterology*, v. 112, n. 3, p. 1000-1016, 1997.

Manders, TTM *et al.* (2020) 'Taxas de sucesso de inoculação dos vários compartimentos de ovos de galinha embrionados em diferentes dias de incubação', *Avian Pathology* , 50(1), pp. 61–77. doi: 10.1080/03079457.2020.1834503.