

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

MURILO HENRIQUE REIS RODRIGUES

**Desafios do desenvolvimento de formulações de medicamentos para a
aquicultura**

Ribeirão Preto
2023

MURILO HENRIQUE REIS RODRIGUES

**Desafios do desenvolvimento de formulações de medicamentos para a
aquicultura**

Versão original

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de bacharel em
Farmácia-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Jonas Augusto
Rizzato Paschoal

Ribeirão Preto
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte. A indicação do trabalho para a Biblioteca Digital foi autorizada pela Comissão de Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Dedico este trabalho aos meus pais, José Rodrigues e Eliana Bercelli dos Reis, por me ensinarem desde cedo a importância da educação e por terem proporcionado todas as condições para que eu pudesse estudar e me formar.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais e aos meus irmãos, por serem a minha base de vida e por todo o apoio que já forneceram e continuam fornecendo.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal, pela paciência, disponibilidade, compreensão e confiança em realizar este trabalho.

À Universidade de São Paulo (USP) e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), por toda a estrutura fornecida durante a graduação.

A todos os membros, técnicos, alunos de pós-graduação e iniciação científica do Laboratório de Cromatografia da FCFRP, pelos conhecimentos compartilhados e por todo o auxílio durante a minha iniciação científica.

À República Vira Tudo, por ser a minha família em Ribeirão Preto, pela amizade e companheirismo que tive durante os anos de graduação e que duram até hoje.

RESUMO

Rodrigues, M. H. R. Desafios do desenvolvimento de formulações de medicamentos para a aquicultura. 2023. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O consumo e a produção global de alimentos advindos da aquicultura vêm crescendo expressivamente a cada ano. Os sistemas intensivos de produção animal são utilizados na aquicultura para aumentar a produtividade e maximizar os lucos. Esses sistemas implicam na criação de um maior número de animais por área, condição que, aliada a possíveis más condições ambientais e de manejo dos animais, geram um ambiente propício para o surgimento e a disseminação de doenças infecciosas. Os medicamentos veterinários, incluindo os antimicrobianos, são utilizados para o controle e tratamento dessas doenças. Entretanto, o uso indevido e indiscriminado desses produtos, além de prejudicar a saúde dos animais e a eficácia do tratamento, aumenta o risco do surgimento e disseminação da resistência antimicrobiana entre os microrganismos patogênicos. Os antimicrobianos ainda são a primeira escolha de tratamento contra doenças infecciosas, sendo que a administração oral através da ração medicamentosa é a via preferencial. Essa via implica em fatores a serem considerados durante a administração, como aqueles relacionados à possível falta de homogeneidade da concentração do ativo entre os pletes de ração, necessidade de se avaliar a estabilidade do ativo durante o processo de administração, biodisponibilidade e risco de lixiviação do ativo para o ambiente aquático. Nesse sentido, a nanotecnologia e a encapsulação de fármacos se apresentam como potenciais estratégias para superar as desvantagens relacionadas à administração convencional de medicamentos para a aquicultura. Esta revisão bibliográfica descreve as principais nanopartículas com potencial aplicação em formulações de medicamentos para a aquicultura, seus materiais constituintes, métodos de preparo e de incorporação na ração, além de aspectos nanotoxicológicos relacionados ao seu uso.

Palavras-chave: Aquicultura. Formulação de medicamentos veterinários. Nanopartículas. Encapsulação de fármacos.

ABSTRACT

Rodrigues, M. H. R. Challenges in developing drug formulations for aquaculture. 2023. Monograph (Bachelor's Thesis) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

The consumption and global production of food from aquaculture have been significantly increasing every year. Intensive animal production systems are used in aquaculture to enhance productivity and maximize profits. These systems involve raising a larger number of animals per area, a condition that, when combined with potential poor environmental conditions and animal management, creates a conducive environment for the emergence and spread of infectious diseases. Veterinary drugs, including antimicrobials, are used to control and treat these diseases. However, the improper and indiscriminate use of these products, in addition to harming animal health and treatment efficacy, increases the risk of the emergence and spread of antimicrobial resistance among pathogenic microorganisms. Antimicrobials are still the first choice for the treatment of infectious diseases, with oral administration through medicated feed being the preferred route. This route involves factors to be considered during administration, such as those related to the possible lack of uniformity in the active ingredient's concentration among the feed pellets, the need to assess the stability of the active ingredient during the administration process, bioavailability, and the risk of leaching the active ingredient into the aquatic environment. In this context, nanotechnology and drug encapsulation are potential strategies to overcome the disadvantages associated with the conventional administration of drugs for aquaculture. This literature review describes the main nanoparticles with potential applications in drug formulations for aquaculture, their constituent materials, preparation methods, and incorporation into feed, as well as nanotoxicological aspects related to their use.

Keywords: Aquaculture. Veterinary drug formulation. Nanoparticles. Drug encapsulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do aumento da área superficial em relação à redução do volume de uma partícula	15
Figura 2 – Esquema dos procedimentos de preparo das nanopartículas bottom-up e top-down.....	17
Figura 3 – Representação esquemática da estrutura da nanoesfera e da nanocápsula.	18
Figura 4 – Representação da estrutura do lipossoma como carreador de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos	20
Figura 5 – Representação esquemática da microemulsão e da nanoemulsão	22
Figura 6 – Representação esquemática da configuração estrutural da matriz lipídica na SLN e no NLC	24
Figura 7 – Representação esquemática do processo de a) spray-drying e b) liofilização para a obtenção de nanopartículas sólidas	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 DESENVOLVIMENTO	15
2.1 NANOTECNOLOGIA	15
2.2 TIPOS DE NANOPARTÍCULAS.....	17
2.2.1 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	17
2.2.2 LIPOSSOMAS.....	19
2.2.3 MICROEMULSÃO E NANOEMULSÃO	21
2.2.4 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS.....	23
2.3 AGENTES DE ENCAPSULAÇÃO	25
2.3.1 POLÍMEROS NATURAIS	25
2.3.2 POLÍMEROS SINTÉTICOS	27
2.3.3 MATERIAIS LIPÍDICOS.....	27
2.4 INCORPORAÇÃO NA RAÇÃO	28
2.5 NANOTOXICOLOGIA	32
3 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma atividade destinada à produção de animais em ambientes aquáticos controlados, tais como viveiros escavados, açudes e tanques-rede. A cada ano que passa fica mais evidente o papel crítico desta atividade, tanto na sua contribuição para o desafio da segurança alimentar global, sendo uma importante fonte de proteína e nutrientes para as populações, quanto no impacto da economia de diversos países em desenvolvimento. De acordo com o relatório anual divulgado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), em 2020, a pesca e a aquicultura atingiram um recorde histórico de 214 milhões de toneladas produzidas, representando um aumento de 3% em relação a 2018 (FAO, 2022). O consumo per capita de alimentos aquáticos atingiu a marca de 20,5 kg em 2020, sendo responsáveis por fornecer aproximadamente 17% da proteína animal mundialmente (FAO, 2022). Em termos de renda, a produção global de animais aquáticos gerou um valor de US\$ 264,8 bilhões, enquanto as exportações de produtos aquáticos totalizaram cerca de US\$ 151 bilhões em 2020 (FAO, 2022). Nesse sentido, para alcançar o crescimento, preservando a saúde dos ecossistemas e garantindo a nutrição das populações, é necessário adotar políticas de gestão para o desenvolvimento global de uma aquicultura sustentável (FAO, 2022).

No Brasil, a produção de peixes e de outros animais aquáticos acompanha a tendência mundial de crescimento. Em 2022, foram produzidas cerca de 860 mil toneladas de peixes de cultivo, um aumento de 2,3% em relação ao total de 841 mil toneladas produzido no ano anterior (Peixe BR, 2023). Desde 2014, ano de oficialização do levantamento estatístico realizado pela Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR), a produção de peixes de cultivo evoluiu 48,6% (Peixe BR, 2023). A Tilápia (*Oreochromis spp.*) é a espécie de destaque do cultivo brasileiro, representando 63,9% da produção nacional, sendo responsável por 88,0% do total exportado e consolidando o país como o 4º maior produtor mundial (Peixe BR, 2023).

Esse cenário de relevância para a atividade é favorecido pelas condições naturais favoráveis existentes nas regiões de produção, como o clima tropical, a abundância de recursos hídricos, a localização geográfica e a versatilidade de produzir espécies nativas e exóticas, além de uma mão de obra capacitada e acessível e um mercado interno consumidor (Peixe BR, 2023; Fogaça, 2020). No entanto, ainda existem diversos desafios para o desenvolvimento da aquicultura nacional,

principalmente relacionados às questões ambientais, saúde dos ecossistemas e prevalência de doenças.

O aumento da produção, com o intuito de maximizar os lucros e atender à demanda, levou a indústria da aquicultura a fazer uso de sistemas de cultivo intensivos, nos quais são produzidos mais animais em espaços cada vez mais reduzidos. Esse cenário, aliado ao ambiente aquático que facilita a transmissão de microrganismos entre os animais, às eventuais más condições de manejo e às alterações nos parâmetros de qualidade da água (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, concentração de amônia etc.), gera um ambiente propício para o surgimento e a disseminação de doenças infecciosas (Luis *et al.*, 2019; Quesada, Paschoal e Reyes, 2013).

Os vírus, as bactérias e os parasitas são comumente os agentes patogênicos causadores de surtos de doenças, sendo as bactérias do gênero *Streptococcus spp.*, *Aeromonas spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Francisella spp.* e *Pasteurella spp.* as principais responsáveis pelo comprometimento da saúde dos peixes (Cavalli *et al.*, 2021). Além disso, a contaminação química e a degradação ambiental ocasionada pelo esgotamento dos recursos hídricos disponíveis nos sistemas intensivos são fatores que impactam diretamente na imunidade dos animais aquáticos, no crescimento do setor e, em determinados casos, inviabilizam a produção (Fajardo *et al.*, 2022; Sarkar *et al.*, 2022; Shah e Mraz, 2020).

A Organização Mundial para Saúde Animal (World Organisation for Animal Health – WOAH) propõe uma abordagem multissetorial e multidisciplinar para a gestão dos riscos globais à saúde. O conceito de Saúde Única (WOAH, 2023, tradução nossa) define que “a saúde humana, animal e vegetal são interdependentes e vinculadas à saúde dos ecossistemas em que existem”. A WOAH estima que 60% dos patógenos causadores de doenças humanas e 75% das doenças humanas infecciosas emergentes possuem origem em animais. Seguindo essa perspectiva, para alcançar o desenvolvimento sustentável dos sistemas de produção animal, é necessário adotar e implementar estratégias que abranjam a interface “homem-animal-planta-ambiente”, com atenção especial ao controle de zoonoses e à resistência antimicrobiana (FAO, 2022).

Os medicamentos veterinários podem ser utilizados ao longo de todo o ciclo produtivo em animais destinados ao consumo humano, com finalidades terapêuticas,

profiláticas, metafiláticas ou ainda como promotores de crescimento (Quesada, Paschoal e Reyes, 2013; Schwarz, Kehrenberg e Walsh, 2001).

No Brasil, enfrentamos um cenário desafiador com a disponibilidade limitada de medicamentos para uso na aquicultura. Atualmente, apenas dois Insumos Farmacêuticos Ativos (IFA) possuem registro nos órgãos regulatórios para uso em peixes de consumo, sendo eles: florfenicol e oxitetraciclina (MAPA, 2023).

Devido a essa situação de poucas alternativas disponíveis, muitos produtores são levados e até mesmo fazem de forma intencional o uso irregular e indiscriminado de medicamentos, seja na tentativa prevenir ou de tratar doenças infecciosas ou, ainda, de aumentar a produtividade encurtando os ciclos de produção (Hill e Li, 2017; Luis *et al.*, 2019; Quesada, Paschoal e Reyes, 2013). O uso irregular desses produtos pode prejudicar a eficácia do tratamento pretendido e, ainda, favorece a seleção de microrganismos resistentes, em especial aos antibióticos (Hill e Li, 2017).

Ademais, por conta das consequências do uso irregular, muitos países restringem o uso de antimicrobianos como aditivos alimentares e como profilaxia (Casewell *et al.*, 2003; Jennings *et al.*, 2016; Shao *et al.*, 2021). Contudo, estes ainda são a primeira escolha de tratamento nos sistemas intensivos de criação, de modo que medidas restritivas ao uso irregular devem ser acompanhadas pelo desenvolvimento de alternativas que promovam o uso eficaz e seguro desses fármacos (Hill e Li, 2017; Huijskens *et al.*, 2016).

A utilização de fármacos na aquicultura ocorre por meio de diversas vias de administração, incluindo a ração medicamentosa, a dispersão desses produtos diretamente na água (banho de imersão), a administração tópica e a injeção (Luis *et al.*, 2019). A via oral, com o fármaco incorporado ou revestido na ração (ração medicamentosa), é o método mais empregado entre os produtores por ser o mais econômico e prático, concebendo maior facilidade de ampliação em escala maior e causar menos estresse aos animais aquáticos durante a administração (Luis *et al.*, 2019; Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Entretanto, a administração oral apresenta algumas problemáticas relacionadas à possível falta homogeneidade do fármaco entre os péletes de ração, à necessidade de se considerar eventual comprometimento da estabilidade do IFA durante o processo de medicação dos animais, à biodisponibilidade do IFA para o animal, à possível lixiviação do IFA da ração para a água e, ainda, à possível alteração da palatabilidade da ração e consequente aceitação da ração pelos animais (Daniel, 2009; Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019; Sarkar

et al., 2022; Schwarz, Kehrenberg e Walsh, 2001). Tais fatores podem comprometer a eficácia do tratamento e influenciar na problemática da resistência antimicrobiana e, portanto, precisam ser considerados.

Nesse sentido, a abordagem de formulações de medicamentos, que representa um sistema de transporte e entrega de compostos a um local alvo específico e de forma funcional, é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de medicamentos para uso na aquicultura. A nanotecnologia e os métodos de encapsulamento podem superar as dificuldades encontradas na administração oral por meio da ração, além de poderem compor estratégias fundamentais no conceito de Saúde Única. Todavia, as possíveis consequências biológicas indesejáveis de alguns materiais a serem utilizados, podendo conferir riscos à saúde do consumidor, bem como, ao meio ambiente, também devem ser avaliadas no desenvolvimento desses sistemas (Fajardo *et al.*, 2022; Hill e Li, 2017; Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019).

Diante do exposto, esta revisão bibliográfica de Trabalho de Conclusão de Curso tem como objetivo analisar e destacar a importância e a aplicabilidade do desenvolvimento de formulações de medicamentos para a aquicultura. Serão descritos os tipos de partículas para encapsulação e suas características, os materiais e os métodos de preparo utilizados ou com potencial de uso. Por fim, serão avaliadas as implicações da nanotoxicidade no contexto da produção animal.

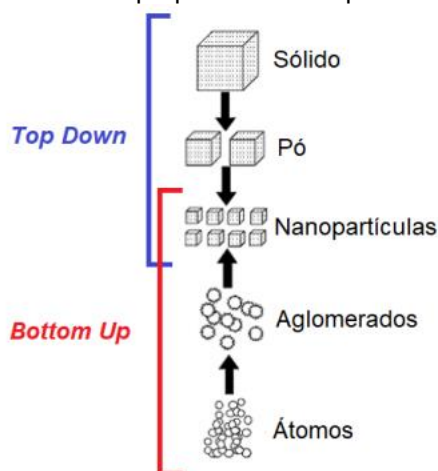
As tecnologias em escala nanométrica possuem grande potencial para contribuir com o desenvolvimento da aquicultura de maneira inovadora (Fajardo *et al.*, 2022). A desinfecção de lagoas e tanques de produção, o tratamento da água, a detecção e o controle de doenças aquáticas, bem como o controle e a redução de contaminantes químicos no ambiente aquático, são algumas das possíveis aplicações dessas ferramentas (Huang *et al.*, 2015; Luis *et al.*, 2019). Entretanto, os sistemas de entrega e liberação de fármacos são o principal foco de pesquisas nesse setor (Dimer *et al.*, 2013; Luis *et al.*, 2019). O conceito de “drug delivery” é definido como métodos de transporte de compostos para determinado local alvo no organismo para exercerem sua atividade biológica (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019).

Na área farmacêutica, veterinária e nanomedicina, o desenvolvimento de nanomedicamentos e formulações visa obter diversas vantagens em relação aos seus homólogos. A encapsulação é um processo de compartimentalização que cria um ambiente adequado para o fármaco ser administrado e o protege de condições adversas do ambiente externo (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). As nanopartículas podem proporcionar maior estabilidade, seja na formulação ou no tempo de residência no organismo animal, e auxiliar na absorção de compostos bioativos, promovendo uma elevada biodisponibilidade no corpo do animal. Com isso, uma maior especificidade de liberação do fármaco é obtida através do direcionamento da entrega em tecidos-alvo (Fajardo *et al.*, 2022; Hill e Li, 2017; Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Além disso, é possível modular o perfil farmacocinético do medicamento, promovendo uma liberação sustentada, retardada ou controlada (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Por fim, ao promover a redução da dose necessária para produzir um efeito equivalente, obtém-se a melhora da eficácia terapêutica e eficiência de tratamento, reduzindo o impacto da liberação desses produtos para outras espécies e para o meio ambiente (Fajardo *et al.*, 2022; Samanta *et al.*, 2022; Sarkar *et al.*, 2022).

No setor de produção animal, estudos sobre o desenvolvimento de sistemas de entrega de medicamentos e produtos bioativos vêm sendo realizados utilizando nanopartículas poliméricas, micelas, emulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, entre outras. Uma ampla variedade de materiais pode ser utilizada na obtenção desses sistemas, incluindo polímeros naturais e sintéticos, lipídeos sólidos, líquidos e de origem natural. Os procedimentos de preparo das nanoestruturas são divididos em bottom-up, através da organização de átomo e moléculas, e top-down,

onde parte-se de materiais na escala macro para conversão em nano (Fajardo *et al.*, 2022).

Figura 2 – Esquema dos procedimentos de preparo das nanopartículas bottom-up e top-down



Fonte: Machado (2021, p. 16).

O sistema mais adequado vai depender das propriedades físico-químicas do fármaco que se deseja encapsular e da sua compatibilidade com os componentes da formulação. Além disso, a compatibilidade dos nanomateriais com o organismo alvo e com os componentes da ração também deve ser considerada. O método de encapsulamento deve ser capaz de manter a estabilidade estrutural do composto e maximizar o seu aprisionamento durante a encapsulação (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Por fim, os aspectos toxicológicos devem ser levados em consideração na avaliação dos impactos que esses sistemas podem causar nos animais e no meio ambiente. Esses pontos citados serão apresentados nos tópicos a seguir através da descrição dos tipos de nanoestruturas encontradas na literatura aplicadas na aquicultura, os materiais que as compõem, os métodos de preparo, os procedimentos de incorporação na ração e a nanotoxicidade.

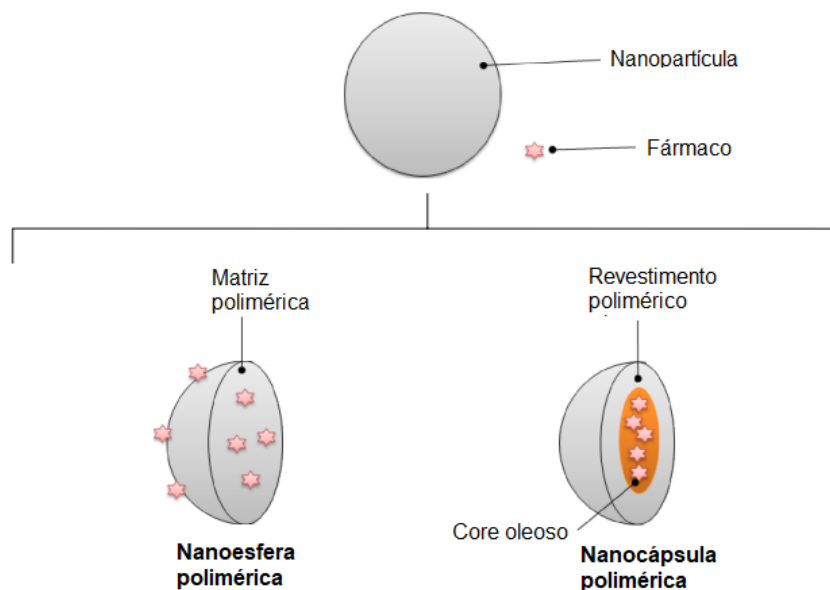
2.2 TIPOS DE NANOPARTÍCULAS

2.2.1 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são estruturas sólidas compostas por polímeros com diâmetro entre 10 e 999 nm, sendo que a faixa de tamanho obtida normalmente varia entre 100 e 500 nm. Essas partículas podem apresentar dois tipos distintos de

estruturas: nanocápsulas e nanoesferas (Figura 3). A nanocápsula consiste em uma partícula de núcleo oleoso onde o fármaco é retido, e um revestimento de polímero. Já a nanoesfera é formada por uma matriz homogênea de polímero, onde o fármaco pode estar dissolvido nessa matriz e/ou adsorvido na superfície (Schaffazick e Guterres, 2003; Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019; Samanta *et al.*, 2022).

Figura 3 – Representação esquemática da estrutura da nanoesfera e da nanocápsula.



Fonte: Adaptada e traduzida de Fonseca-Santos, Gremião e Chorilli (2015).

A utilização desse tipo de estrutura possibilita o uso de uma grande variedade de polímeros, sejam naturais ou sintéticos; e o encapsulamento de moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas, dependendo da composição do polímero como material de encapsulação e do método de preparo (Hill e Li, 2017). Além disso, essas nanopartículas promovem uma alta eficiência de encapsulamento, em especial para fármacos lipofílicos, e uma maior estabilidade do fármaco encapsulado (Samanta *et al.*, 2022; Sarkar *et al.*, 2022; Souto, Severino e Santana, 2012). Entretanto, o uso de solventes tóxicos no preparo para a solubilização do polímero é uma desvantagem encontrada nas nanopartículas poliméricas. Nesse sentido, a quantificação dos resíduos de solventes no final do processo de síntese é necessária para verificar se está dentro dos limites aceitáveis ou se deve ser utilizado um solvente com baixa toxicidade, como o etanol, dependendo do tipo de polímero da composição.

As nanopartículas poliméricas possuem em sua composição, além do material polimérico, solventes orgânicos e tensoativos. Os solventes orgânicos devem

apresentar características como capacidade de solubilização do polímero, baixo ponto de ebulição - o que facilita a sua remoção - e preferencialmente ser capaz de dissolver o fármaco para promover uma distribuição homogênea na partícula. O etanol, a acetona, o hexano e o diclorometano são exemplos de solventes utilizados na síntese dessas estruturas (Souto, Severino e Santana, 2012).

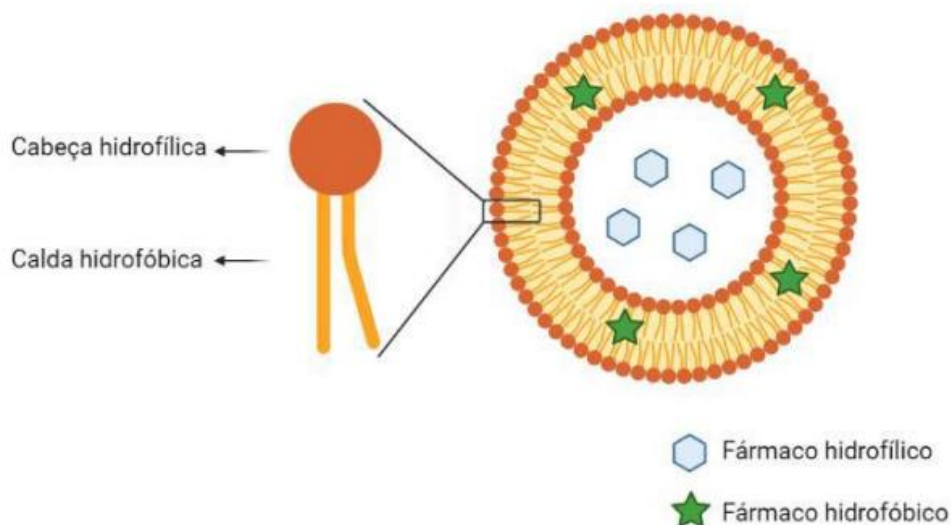
O tensoativos são moléculas anfifílicas superficiais responsáveis pela redução da tensão superficial entre as partículas e o meio, o que resulta na redução do seu diâmetro. Além disso, esses materiais são utilizados para a estabilização das nanopartículas, promovendo a manutenção do tamanho dentro da faixa estabelecida, sem que ocorra aglomeração ou agregação. Os tensoativos comumente utilizados incluem os polissorbatos (Tween 20, 60 e 80), o monooleato de Sorbitan (Span 60), o poloxamer (Pluronic) e o acetato de polivilina (PVA) (Souto, Severino e Santana, 2012).

Diferentes métodos podem ser utilizados para a obtenção de nanoesferas ou nanocápsulas. Os métodos de emulsificação-evaporação do solvente e salting-out são específicos para o preparo do primeiro tipo, enquanto a nanoprecipitação e emulsificação-difusão do solvente são aplicáveis para ambas as estruturas (Samanta *et al.*, 2022; Souto, Severino e Santana, 2012). Além disso, a gelificação iônica e a polimerização *in situ* são métodos que permitem o uso de uma ampla gama de polímeros naturais (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019; Samanta *et al.*, 2022).

2.2.2 Lipossomas

Os lipossomas (Figura 4) são vesículas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas concêntricas de fosfolípidos e colesterol que circundam e compartimentalizam um meio aquoso (Batista *et al.*, 2007). Os fosfolípidos em solução se organizam espontaneamente em bicamadas, levando à formação dessas vesículas, as quais apresentam regiões hidrofílicas e hidrofóbicas (Batista *et al.*, 2007). Sendo assim, essas estruturas podem atuar como sistema de entrega de fármacos hidrofílicos, que ficam retidos no compartimento aquoso, e lipofílicos, que permanecem interagindo na bicamada lipídica (Batista *et al.*, 2007; Sarkar *et al.*, 2022). Além disso, os fármacos anfifílicos podem permanecer interagindo entre a bicamada e o compartimento aquoso.

Figura 4 – Representação da estrutura do lipossoma como carreador de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos



Fonte: Adaptada de Santos *et al.* (2023).

Os lipossomas podem ser do tipo unilamelar, contendo uma única bicamada lipídica, ou multilamelar, contendo várias bicamadas concêntricas (Batista *et al.*, 2007). Além disso, podem ser classificados de acordo com as propriedades de interação com os sistemas biológicos. Os lipossomas convencionais são constituídos de fosfolípidos de carga positiva, catiônicos, ou negativa, aniônicos, e são facilmente removidos do organismo pelo sistema imunológico (Batista *et al.*, 2007). Os lipossomas de longa circulação contêm um revestimento superficial hidrofílico que promove um aumento no tempo de residência dessas partículas no organismo (Batista *et al.*, 2007). Os lipossomas sítio-específicos contêm lipídeos modificados que possibilitam a conjugação de ligantes de reconhecimento, os quais aumentam a especificidade de interação das nanopartículas com as células-alvo e a quantidade de ativos encapsulados nas células (Batista *et al.*, 2007). Por fim, os lipossomas polimórficos são partículas que se tornam reativas devido a alterações em suas estruturas provocadas por mudanças de pH, temperatura e/ou carga elétrica (Batista *et al.*, 2007).

A utilização de lipossomas como carreadores de fármacos ocorre devido a essas estruturas proporcionarem entrega direcionada e liberação sustentada, serem compatíveis com sistemas biológicos, serem biodegradáveis e não tóxicas, aumentarem a biodisponibilidade do ativo e possibilitarem a encapsulação de múltiplos compostos (Samanta *et al.*, 2022; Sarkar *et al.*, 2022). Entretanto, baixa

eficiência de encapsulamento e baixa estabilidade de armazenamento são algumas desvantagens relatadas para os lipossomas, as quais podem ser superadas pela adição de revestimento extra nas partículas formadas (Dima, Dima e Iordăchescu, 2015; Samanta *et al.*, 2022; Shin, Kim e Park, 2015).

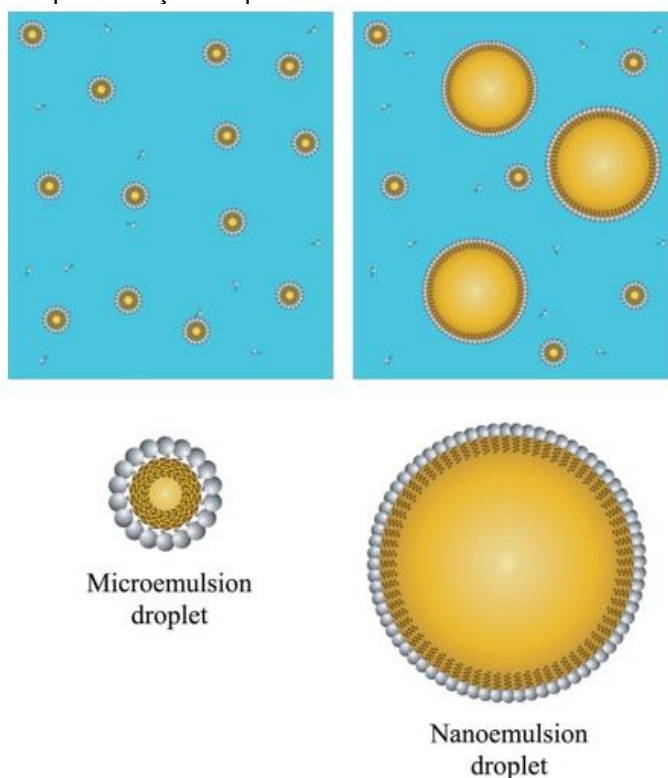
Os principais métodos de produção de lipossomas são a hidratação da camada lipídica e a injeção etanólica (Batista *et al.*, 2007; Samanta *et al.*, 2022). Esses procedimentos favorecem a encapsulação de fármacos lipofílicos (Batista *et al.*, 2007). Técnicas mecânicas como sonicação, extrusão em membrana de policarbonato e homogeneização a alta pressão são utilizadas para reduzir o diâmetro das estruturas e produzir partículas mais homogêneas (Batista *et al.*, 2007).

2.2.3 Microemulsão e nanoemulsão

As microemulsões e nanoemulsões (Figura 5) são definidas como sistemas de entrega coloidais de fármacos formados pela dispersão de dois líquidos imiscíveis, estabilizadas por emulsificantes (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019; McClements, 2012; Samanta *et al.*, 2022). Assim como ocorre nas nanopartículas poliméricas, o emulsificante atua na diminuição do tamanho da partícula, reduzindo a tensão superficial entre essa estrutura e o meio líquido. Além disso, esse componente contribui para a estabilidade desses sistemas (Gupta *et al.*, 2016). Tensoativos anfifílicos, polímeros naturais e sintéticos, proteínas e lipídeos são exemplos de emulsificantes que podem ser utilizados no preparo dessas estruturas (Gupta *et al.*, 2016).

Dependendo da composição de cada fase da microemulsão e nanoemulsão, é possível encapsular tanto fármacos lipofílicos quanto hidrofílicos. Sistemas do tipo óleo em água (O/A) são comumente projetados para encapsular compostos lipofílicos, enquanto sistemas do tipo água em óleo (A/O) são usados para composto hidrofílicos (McClements, 2012). Entretanto, é possível desenvolver estruturas de três ou mais fases, separadas ou contínuas, que estejam em estabilidade entre elas, tais como sistemas A/O/A e O/A/O (McClements, 2012).

Figura 5 – Representação esquemática da microemulsão e da nanoemulsão



Fonte: McClements (2012, p. 1721).

Existem diferenças consideráveis em relação à faixa de tamanho e propriedades de estabilidade que distinguem as microemulsões das nanoemulsões. De acordo com McClements (2012), microemulsão é uma dispersão coloidal termodinamicamente estável que consiste em pequenas partículas de duas fases líquidas imiscíveis, uma dispersa na outra. A faixa média de tamanho obtida por essas partículas varia entre 10 e 100 nm (Gupta *et al.*, 2016).

Em contrapartida, a nanoemulsão é uma dispersão coloidal líquido-em-líquido cineticamente estável e termodinamicamente instável, ou seja, após um determinado tempo ocorrerá a separação entre as fases (Gupta *et al.*, 2016; McClements, 2012). Essas partículas possuem um tamanho médio menor que 500 nm (McClements, 2012; Singh *et al.*, 2017). A diferença de tamanho existente entre os dois sistemas ocorre devido à microemulsão requerer uma maior quantidade de emulsificante em sua composição (McClements, 2012).

As microemulsões e nanoemulsões podem constituir partículas em si ou serem componentes de outras estruturas. Por exemplo, o core oleoso de uma nanocápsula pode ser constituído de uma emulsão. Esses sistemas são desenvolvidos para proteger e aumentar a viabilidade dos ativos contra condições adversas do ambiente

(Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Além disso, são consideradas de fácil preparo, possuem técnicas de produção escalonáveis e possibilitam a aplicação de uma ampla faixa de tamanho de partícula (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019).

A nanoemulsão é preferível para sistemas de entrega de ativos devido à menor quantidade de emulsificantes requerida para o seu preparo (Samanta *et al.*, 2022). Entretanto, o tamanho da partícula e a quantidade de emulsificante na composição influenciam diretamente na estabilidade dessas estruturas, o que pode prejudicar o seu armazenamento (Samanta *et al.*, 2022).

Para o preparo dessas estruturas, são utilizados métodos de alta energia em nanoemulsões e métodos de baixa energia em microemulsões, ambos baseados no princípio de misturar a fase aquosa, a oleosa e os emulsificantes. Devido à sua termodinâmica estável, as microemulsões são sistemas que podem se formar espontaneamente (McClements, 2012). Procedimentos que envolvem o uso de homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e sonicação são empregados para a produção de nanoemulsões (McClements, 2012). Por outro lado, métodos de emulsificação espontânea e temperatura de inversão de fase são considerados de baixa energia (McClements, 2012).

2.2.4 Nanopartículas lipídicas

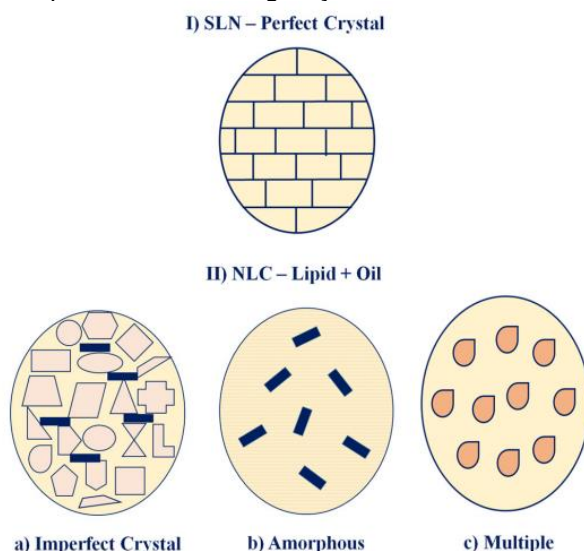
As nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) (Figura 6) são um sistema de entrega de fármacos produzido a partir de um tipo de lipídeo sólido, dispersos em soluções aquosas e estabilizadas por agentes emulsificantes (Müller, Radtke e Wissing, 2002; Khosa, Reddi e Saha, 2018). Essas partículas podem encapsular principalmente ativos lipofílicos, são biocompatíveis, simples de serem produzidas, têm escalabilidade de produção e podem não necessitar de solventes orgânicos para o preparo (Khosa, Reddi e Saha, 2018). Entretanto, apresentam desvantagens como baixa capacidade de carregamento de fármacos, expulsão do ativo encapsulado durante o armazenamento e alto teor de água em dispersões aquosas (Müller, Radtke e Wissing, 2002; Khosa, Reddi e Saha, 2018). Isso ocorre devido ao processo de cristalização do lipídeo da nanoestrutura durante o armazenamento (Khosa, Reddi e Saha, 2018).

Os carreadores lipídicos nanoestruturas (NLC) (Figura 6) foram desenvolvidos para superar as desvantagens das SLN. Eles são formados por uma mistura de

lipídeos sólidos e líquidos, ou óleos, o que resulta em uma organização especial da matriz lipídica, promovendo maior capacidade de armazenamento de fármacos e menos expulsão do ativo durante a estocagem (Khosa, Reddi e Saha, 2018). Essas nanopartículas são classificadas em 3 tipos: imperfeito, amorfo e múltiplo; sendo diferenciadas pela forma de organização da matriz lipídica, composição e proporção entre lipídeos sólidos e óleos. A faixa de tamanho obtida varia entre 10 e 1000 nm (Khosa, Reddi e Saha, 2018).

O tipo “imperfeito” de NLC consiste em uma mistura de ácidos graxos de diferentes estruturas, o que resulta no aumento da distância entre as cadeias carbônicas e causa imperfeições durante o processo de cristalização da matriz (Müller, Radtke e Wissing, 2002; Khosa, Reddi e Saha, 2018). O tipo “amorfo” resulta da falta de ordenação da matriz lipídica devido à mistura de lipídeos líquidos especiais com lipídeos sólidos (Müller, Radtke e Wissing, 2002; Khosa, Reddi e Saha, 2018). O tipo “múltiplo” é composto por uma maior quantidade de lipídeos líquidos, onde a solubilidade do óleo no lipídeo sólido é excedida, levando à formação de nanocompartimentos oleosos (Müller, Radtke e Wissing, 2002; Khosa, Reddi e Saha, 2018).

Figura 6 – Representação esquemática da configuração estrutural da matriz lipídica na SLN e no NLC



Fonte: Khosa, Reddi e Saha (2018, p. 599).

As nanopartículas lipídicas, em especial os NLC, são usados como uma alternativa a outras nanoestruturas lipídicas, como lipossomas, microemulsões e nanoemulsões, com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade do fármaco

encapsulado (Samanta *et al.*, 2022; Sarkar *et al.*, 2022). Além disso, esse sistema oferece maior estabilidade em relação a fatores físico-químicos e bioquímicos, como sais, pH e enzimas (Ban *et al.*, 2015). No entanto, em relação à estabilidade a longo prazo, é observado o fenômeno de agregação e gelificação nessas estruturas, para o qual a liofilização e a adição de conservantes podem ser soluções mitigadoras (Khosa, Reddi e Saha, 2018).

Existem diversos métodos para a preparação das nanopartículas lipídicas, dos quais podemos destacar a microemulsão à quente, emulsificação e evaporação do solvente, difusão do solvente, secagem por aspersão e homogeneização a alta pressão (Müller, Radtke e Wissing, 2002; Müller, Shegokar e Keck, 2011; Khosa, Reddi e Saha, 2018). Alguns métodos são de fácil produção e não exigem equipamentos complexos, como a microemulsão à quente. No entanto, esse método resulta em partículas com concentrações muito baixas (Müller, Shegokar e Keck, 2011). A homogeneização a alta pressão é preferível por ser um método escalonável, adequado para produção laboratorial ou industrial e por oferecer maior controle na distribuição do tamanho das partículas (Müller, Shegokar e Keck, 2011).

2.3 AGENTES DE ENCAPSULAÇÃO

2.3.1 Polímeros naturais

O alginato é um polímero natural encontrado em algas marrons pertencentes à classe *Phaeophyceae* ou produzido por bactérias do gênero *Azotobacter spp.* e *Pseudomonas spp.* (Iwaki, 2010; Müller, Santos e Brígido, 2011). É constituído por subunidades de ácidos α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos unidos por ligações glicosídicas (1→4) (Iwaki, 2010; Müller, Santos e Brígido, 2011). Esse material possui a propriedade de formar géis hidrofílicos na presença de cátions bivalentes, como Ca^{+2} e Mg^{+2} , e constitui sistemas de entrega poliméricos (Müller, Santos e Brígido, 2011; Silva *et al.*, 2010). Além disso, o alginato pode atuar como emulsificante, espessante, estabilizante e material de revestimento em formulações de medicamentos (Iwaki, 2010; Fajardo *et al.*, 2022).

A utilização desse polímero ocorre devido à sua biocompatibilidade com os sistemas biológicos, à simplicidade de preparo e ao baixo custo (Masoomi Dezfooli *et*

al., 2019). As nanopartículas de alginato podem promover uma liberação direcionada de ativos no intestino dos animais, proporcionando maior estabilidade e biodisponibilidade (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Fatores como temperatura e pH extremos influenciam na qualidade de preparo polímero, pois pode ocorrer hidrólise ou despolimerização das cadeias do alginato (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Uma combinação com diferentes polímeros, como a quitosana, pode aumentar a eficiência do sistema de entrega (Fajardo *et al.*, 2022).

A quitosana é um polissacarídeo catiônico formado por subunidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina em diferentes proporções (Silva, 2018; Kobashigava, 2021). É obtida através da desacetilação da quitina, a qual está presente no exoesqueleto de crustáceos e insetos (Silva, 2018; Kobashigava, 2021). Por possuir grupos reativos para ligação cruzada e apresentar alta viscosidade, a quitosana possui propriedades de polimerização e é um material utilizado para encapsulação de fármacos (Kobashigava, 2021).

Esse composto possui boa compatibilidade com os sistemas biológicos, além de ser atóxico e biodegradável (Fajardo *et al.*, 2022; Samanta *et al.*, 2022). A quitosana apresenta propriedades mucoadesivas, o que facilita o transporte de ativos através das células do epitélio intestinal (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Quando esse biopolímero é utilizado como camada de revestimento, pode conferir estabilidade à nanoestrutura frente ao pH básico da água do mar (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Além disso, pode ocorrer o aumento da eficácia do tratamento contra microrganismos patogênicos e conferir proteção às nanopartículas devido à sua atividade antibacteriana (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019; Schwarz, Kehrenberg e Walsh, 2001).

A gelatina é um polímero à base de proteínas obtido de tecidos animais que contenham colágeno, como subprodutos da indústria da carne e do couro (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Esse material é utilizado como agente de encapsulamento devido ao seu baixo custo, à sua não toxicidade e à sua biodegradabilidade (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Devido à pequena diferença entre as temperaturas de fusão e gelificação, nas quais o gel é produzido em temperatura ambiente, esse polímero não é comumente utilizado como material isolado para o preparo de nanopartículas, sendo mais efetivo quando associado ao alginato ou à quitosana (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019; Samanta *et al.*, 2022). Além disso, a gelatina pode constituir filmes de revestimento de nanopartículas, os quais protegem e modulam o perfil de liberação de ativos (Fajardo *et al.*, 2022).

2.3.2 Polímeros sintéticos

Os polímeros sintéticos são amplamente utilizados como materiais para o desenvolvimento de sistemas de entrega de medicamentos e podem ter aplicações na encapsulação de ativos na psicultura (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Eles possuem a vantagem da maior reprodutibilidade lote a lote em relação aos polímeros naturais (Dimer *et al.*, 2013). Entretanto, podem ser utilizados em associação com o alginato ou a quitosana para melhorar as propriedades das nanopartículas.

O ácido láctico-co-glicólico (PLGA) é um polímero sintético à base de poliéster mais comumente usado em formulações de medicamentos devido às suas características de ser biocompatível e biodegradável nos sistemas biológicos (Danhier *et al.*, 2012; Makadia e Siegel, 2011). É formado pelos monômeros ácido polilático (PLA) e ácido poliglicólico (PGA) e pode ser utilizado para encapsular uma variedade de compostos, como proteínas e peptídeos, material genético, probióticos e medicamentos (Makadia e Siegel, 2011).

Esse material possui uma longa experiência clínica, sendo aprovado pelas agências de regulação U.S Food and Drug Administration (FDA) e Agência Europeia de Medicamentos (EMA) para sistemas de entrega de medicamentos em humanos (Makadia e Siegel, 2011; Samanta *et al.*, 2022). Além disso, o PLGA possui boa absorção pelas células do epitélio intestinal de peixes (Samanta *et al.*, 2022). Entretanto, deve-se ter cautela em seu uso, pois, para o preparo de nanopartículas utilizando esse polímero, é necessário o uso de solventes orgânicos (Samanta *et al.*, 2022).

Outros polímeros sintéticos também são relatados na síntese de nanopartículas, como a policaprolactona (PCL), poli (n-butil-cianoacrilato) (PCA), poli (β -hidroxibutirato) (PHB) e ftalato de acetato de celulose (CAPH) (Samanta *et al.*, 2022). Apesar de esses polímeros apresentarem as características de compatibilidade e degradabilidade, a possível toxicidade resultante da administração de polímeros e de seus metabólitos necessita ser avaliada (Makadia e Siegel, 2011).

2.3.3 Materiais lipídicos

Os fosfolipídios são compostos constituídos por uma molécula de glicerol ligada a duas porções de ácidos graxos, que podem ser saturados ou insaturados, e uma

cabeça polar composta por um grupo fosfato interagindo com um grupo radical variado, conferindo caráter anfótero ou polar a esse composto (Shen, 2020). Essas moléculas compõem principalmente as estruturas dos lipossomas. Os principais fosfolipídios utilizados em formulações de medicamentos são a fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS) e esfingomielina (SPH), os quais formam uma bicamada em solução aquosa (Batista *et al.*, 2007). Em especial, a fosfatidilcolina apresenta vantagens de estabilidade em variações de pH e concentração de sal no meio (Batista *et al.*, 2007).

Os ácidos graxos são moléculas constituídas por cadeias de hidrocarbonetos de tamanho variável, podendo ou não conter insaturações ao longo da cadeia. A presença e o número de insaturações definem o grau de empacotamento dessas moléculas e influenciam na sua temperatura de fusão, existindo no estado sólido ou líquido à temperatura ambiente. O óleo de soja, óleo de semente de algodão, óleo de coco, ácido oleico e oleato de etila foram relatados como constituintes da fase oleosa no preparo de micro e nanoemulsões (Singh *et al.*, 2017). Além disso, misturas de lipídeos sólidos e líquidos, como hidroxioctacosanil-hidroxiestearato e isopropilmiristato, são utilizadas para manter a estrutura do NLC após a solidificação (Müller, Radtke e Wissing, 2002).

Os triglicerídeos são compostos tri-éster, nos quais três moléculas de ácidos graxos estão em ligação éster com uma molécula de glicerol. Eles são classificados de acordo com o tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo, sendo rotulados como triglicerídeos de cadeia longa (LCT), triglicerídeos de cadeia média (MCT) ou triglicerídeos de cadeia curta (SCT) (Müller, Shegokar e Keck, 2011). Esses lipídeos também são utilizados como fase orgânica no preparo de microemulsão, nanoemulsão, SLN e NLC (Müller, Radtke e Wissing, 2002; Müller, Shegokar e Keck, 2011).

2.4 INCORPORAÇÃO NA RAÇÃO

A suscetibilidade dos peixes a doenças infecciosas é inerente aos sistemas de produção intensiva encontrados na aquicultura (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Por conta disso, o uso de medicamentos veterinários se faz necessário nesse modelo produtivo. Apesar de existirem alternativas para o uso de antibióticos, como produtos naturais, incluindo probióticos e óleos essenciais, imunoprofilaxia e vacinação, essas

medidas são mais adequadas como uma forma de prevenção adicional (Schwarz, Kehrenberg e Walsh, 2001). Sendo assim, os antimicrobianos ainda são a primeira opção de escolha no controle e tratamento de doenças infecciosas na aquicultura (Hill e Li, 2017; Huijskens *et al.*, 2016).

A administração oral de medicamentos através da ração é a opção mais viável e eficaz para a entrega desses produtos aos animais aquáticos (Daniel, 2009; Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). A dispersão de fármacos diretamente na água, conhecida como banho de imersão, pode ser inacessível para os animais, fornecer dosagens insuficientes, provocar maior contaminação no ambiente aquático e ocasionar problemas de estabilidade para o ativo (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Além disso, ao tratar simultaneamente muitos animais, a vacinação possui limitações devido à dificuldade de manejo, além de ser um método invasivo e causar estresse aos animais (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019).

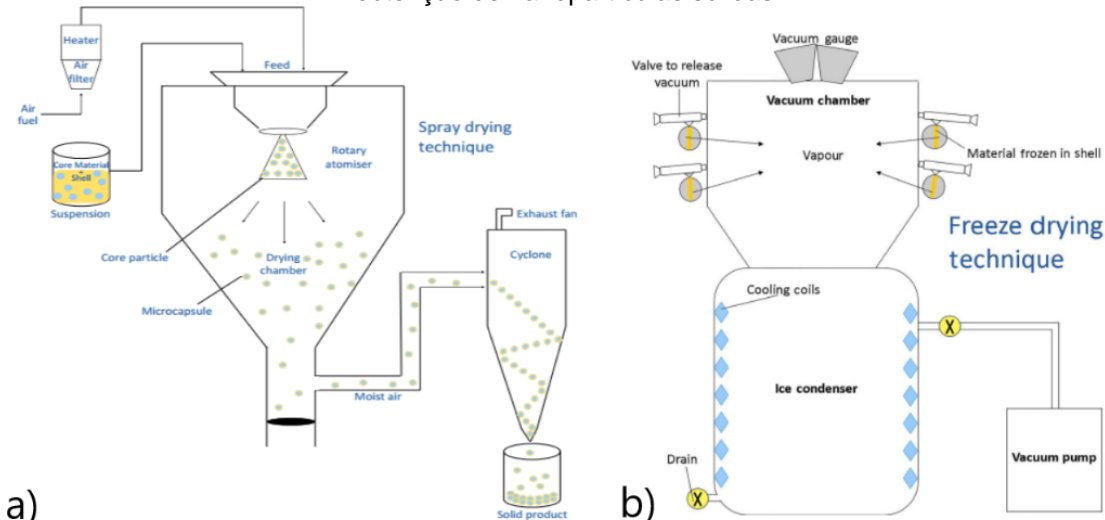
Para garantir a eficácia do tratamento, os animais devem estar se alimentando ativamente. Sendo assim, uma possível limitação para os fármacos incorporados na ração é o baixo consumo e até mesmo o interrupção do consumo de alimentos pelos animais afligidos (Daniel, 2009). Essa limitação pode ser superada pelo uso de nanopartículas e a encapsulação de fármacos, a qual promove direcionamento de entrega específica, redução da dose para produzir efeito terapêutico equivalente e alteração no perfil de liberação do medicamento no organismo animal (Fajardo *et al.*, 2022; Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019).

A caracterização das nanoestruturas preparadas, antes de realizar a incorporação no alimento, é fundamental para definir suas características de tamanho e propriedades de superfície (Lin *et al.*, 2014). Métodos de microscopia eletrônica de varredura (MEV) ou de transmissão (MET) e microscopia óptica são utilizados para verificar a morfologia, o tamanho e a distribuição de tamanho das nanopartículas (Ahmed *et al.*, 2019; Qu *et al.*, 2023). Equipamentos como o Zetasizer NanoZS Malvern® podem ser aplicados para verificar o espalhamento de luz dinâmico (DLS), que avalia o diâmetro da nanoestrutura, e o potencial zeta, que reflete a carga superficial da nanopartícula e contribui para sua estabilidade elétrica e eletroestérica (Bhattacharjee, 2016; Lin *et al.*, 2014). Por fim, a eficiência de encapsulamento e a avaliação do perfil de liberação são utilizados para quantificar o ativo encapsulado e confirmar que se trata de um sistema de liberação modificado (Lin *et al.*, 2014).

O método de processamento da ração é uma etapa determinante na escolha do tipo de nanopartícula utilizada para encapsulação e dos seus materiais constituintes. Além disso, deve-se avaliar a compatibilidade desses materiais com os ingredientes e aditivos da ração (Daniel, 2009). A peletização e a extrusão são os dois métodos processos de produção mais comumente usados nas indústrias de produção de ração, sendo a extrusão a principal para organismos aquáticos (Melendez-Arevalo, 2019; Moro e Rodrigues, 2015). Por envolver uma sucessão de ciclos com altas temperaturas, tensões de cisalhamento e pressões, a extrusão pode afetar a estabilidade estrutural das nanopartículas e dos fármacos encapsulados (Melendez-Arevalo, 2019; Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). O processo de peletização também envolve processos mecânicos que combinam umidade, pressão e calor, sendo mais adequado para compostos e materiais termoestáveis (Melendez-Arevalo, 2019; Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019).

As nanopartículas produzidas devem preferencialmente ser formuladas em forma de pós secos para serem incorporadas à ração (Daniel, 2009; Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). A formulação em pó é preferível devido à possibilidade de obtenção de uma distribuição granulométrica bem definida e à maior estabilidade do produto seco (Daniel, 2009; Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Nesse sentido, os processos de liofilização e secagem por pulverização (spray-drying) podem ser empregados para obtenção de pós secos (Araújo, 2009). A liofilização consiste na sequência de congelamento seguido da redução da pressão, o que faz com que o material líquido presente na formulação sublime, obtendo um produto final em pó (Araújo, 2009; Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Neste processo, crioprotetores, como açúcares, glicerol, álcool polivinílico e gelatina, podem ser adicionados para conferir maior estabilidade para a formulação final (Alihosseini *et al.*, 2015; Araújo, 2009; Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). A técnica de spray-drying basicamente consiste na dispersão do líquido em gotículas por um atomizador, seguido da passagem de uma corrente de ar aquecido, resultando na evaporação do solvente e na formação das partículas sólidas (Araújo, 2009; Oliveira e Petrovick, 2010).

Figura 7 – Representação esquemática do processo de a) spray-drying e b) liofilização para a obtenção de nanopartículas sólidas



Fonte: Adaptada de Masoomi Dezfooli *et al.* (2019).

A incorporação da formulação pode ser feita no início ou no final da linha de produção da ração (Daniel, 2009). No primeiro caso, as nanopartículas e os ingredientes do alimento devem estar em uma faixa de tamanho uniforme para que haja maior homogeneidade no processo de pré-mistura (Melendez-Arevalo, 2019; Daniel, 2009). Através desse processo, obtém-se uma boa homogeneidade na concentração do fármaco na ração (Daniel, 2009). Entretanto, uma desvantagem da incorporação inicial na pré-mistura é o risco de contaminação de toda a linha de produção de rações, podendo ocorrer contaminação cruzada com outras rações medicamentosas ou rações não medicadas (Daniel, 2009). A utilização de equipamentos dedicados, a segmentação da linha de produção com a limpeza completa dos equipamentos a cada processo ou a incorporação direta na ração final podem ser usadas para superar essa desvantagem (Daniel, 2009).

Por outro lado, a formulação pode ser incorporada à ração ao final da linha de fabricação, por meio do revestimento dos grânulos com a formulação (Daniel, 2009; Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Nesse caso, a formulação é pulverizada ou dispersa sobre a superfície da ração após a peletização ou extrusão (Daniel, 2009; Dezfuly *et al.*, 2020). O revestimento superficial adicional com óleo vegetal, polímeros naturais e sintéticos ou gelatina pode ser utilizado para garantir maior estabilidade na formulação incorporada. Esse procedimento é o mais indicado para fármacos e formulações sensíveis aos processos de extrusão e peletização (Daniel, 2009; Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Entretanto, a dificuldade de obter a homogeneidade da concentração do

fármaco suficiente na ração e a lixiviação da nanopartícula para a água são fatores que limitam a utilização desse método (Daniel, 2009).

O comportamento alimentar dos animais também deve ser levado em consideração na incorporação da formulação na ração (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Na aquicultura, rações flutuantes são mais adequadas para a alimentação dos peixes (Masoomi Dezfooli *et al.*, 2019). Devido a isso, a compatibilidade entre os constituintes da ração e da formulação deve manter a propriedade de flutuabilidade para a alimentação eficaz dos animais. A palatabilidade da ração após a incorporação influencia na aceitação do alimento pelos animais (Daniel, 2009). Em um estudo realizado por Rigos, Alexis e Nengas (1999), foi demonstrada uma redução de 90% no consumo de ração revestida com oxitetraciclina por robalos (*Centropomus spp.*). Nesse sentido, a encapsulação do ativo e o revestimento da superfície podem ser benéficos para manter a aceitação dos alimentos pelos animais.

2.5 NANOTOXICOLOGIA

A nanotecnologia é uma tecnologia inovadora e próspera; no entanto, seus riscos precisam ser avaliados. Nesse sentido, a nanotoxicologia compreende o estudo da toxicidade dos nanomateriais nos sistemas biológicos e no meio ambiente (Horquen da Silva *et al.*, 2014). Esse estudo tem como foco principal a elucidação de como as propriedades físico-químicas das nanoestruturas, como tamanho, forma, área de superfície e composição, induzem respostas biológicas tóxicas (Jesus e Castro, 2013). Por fim, a nanotoxicologia engloba a compreensão dos aspectos regulatórios e da biodistribuição das nanoestruturas, além da análise em níveis moleculares, como a genotoxicidade, de seus possíveis riscos para o meio ambiente, a saúde humana e os animais (Bello e Leong, 2017).

A potencial toxicidade das nanopartículas tem suscitado preocupações entre as autoridades e pode afetar a opinião pública em relação às aplicações dessa tecnologia, especialmente no que diz respeito aos animais destinados ao consumo humano. Durante o desenvolvimento das nanoestruturas, é necessário realizar uma avaliação cuidadosa do perfil de segurança desses produtos e garantir transparência na divulgação de informações relevantes tanto para o público e quanto para os órgãos regulatórios (Müller, Shegokar e Keck, 2011). A abordagem nanotoxicológica fornece suporte para que os protocolos de testes sejam confiáveis e robustos, bem como para

obter dados precisos e suficientes para analisar os possíveis impactos dos nanomateriais. Além disso, a nanotoxicologia também envolve o conceito de “One Health”, fundamental para uma avaliação holística sobre o tema, considerando os riscos ambientais, aos animais e aos seres humanos interdependentes e indissociáveis.

Os testes de nanotoxicidade são fundamentais para um entendimento abrangente das possíveis consequências biológicas indesejáveis dos nanomateriais, servindo também de base para as questões regulatórias relacionadas ao seu uso seguro em ambientes aquáticos e na aquicultura (Sarkar *et al.*, 2022). A literatura disponível apresenta uma escassez de estudos que avaliam a toxicidade das nanopartículas na aquicultura, uma vez que a maioria deles concentra-se na avaliação da eficácia desses sistemas de entrega.

Um estudo realizado por Handy, Owen e Valsami-Jones (2008) abordou a base teórica da toxicologia em peixes, investigando a possível farmacocinética das nanopartículas. Eles indicaram uma predominância da absorção por endocitose pelas guelras, intestino e fígado, bem como o metabolismo e excreção hepática na bile. No entanto, os autores também observaram que faltam evidências de campo para sistematizar os conhecimentos em relação aos efeitos dos nanomateriais em peixes.

Em outro estudo, Handy *et al.* (2011) forneceram uma avaliação geral dos efeitos letais e subletais dos nanomateriais em algumas espécies de peixes, concluindo que essas matérias apresentam uma toxicidade relativamente baixa em comparação a outros produtos químicos, como agroquímicos e pesticidas, amplamente utilizados na indústria aquícola.

A genotoxicidade é uma indesejável consequência biológica associada aos nanomateriais, que requer avaliação cuidadosa. Devido ao seu tamanho nanométrico, as nanopartículas podem ser internalizadas pelas células, desencadeando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres, levando ao estresse oxidativo celular e, consequentemente, danos potenciais às proteínas e ao material genético (Fajardo *et al.*, 2022). Esse mecanismo de toxicidade decorre da reatividade química inerente aos nanomateriais, sendo mais proeminente em nanopartículas com diâmetros inferiores a 100 nm, que são absorvidas por endocitose em todos os tipos celulares (Fajardo *et al.*, 2022; Müller, Shegokar e Keck, 2011).

A imunogenicidade ocorre quando uma resposta imunológica é desencadeada no organismo animal devido à presença de uma substância considerada estranha.

Embora os polímeros naturais e outros nanomateriais derivados da natureza sejam mais adequados para a administração em animais, esses compostos também podem desencadear respostas imunogênicas (Hill e Li, 2017). No entanto, o entendimento dos efeitos das nanopartículas no sistema imunológico dos peixes é limitado (Handy *et al.*, 2011).

Outro critério de toxicidade que deve ser levado em consideração é a biopersistência dos nanomateriais no organismo dos peixes. Há um maior risco quando as nanopartículas não são degradadas, metabolizadas e excretadas (Müller, Shegokar e Keck, 2011). A permanência e o acúmulo de nanopartículas ou de resíduos de seus materiais no sistema digestivo podem prejudicar a absorção de outros nutrientes (Hill e Li, 2017). Mesmo que os nanomateriais mencionados sejam consideradas biodegradáveis, a presença desses compostos em tecidos destinados ao consumo humano precisa ser mais bem compreendida (Hill e Li, 2017).

A administração de formulações de medicamentos através da ração pode promover uma nova fonte de contaminação de nanomateriais liberados no meio ambiente aquático (Fajardo *et al.*, 2022). Estudos de nanotoxicologia também são utilizados para avaliar os potenciais riscos ao meio ambiente que esses compostos podem causar, além de servirem de base para a definição de aspectos regulatórios (Fajardo *et al.*, 2022). O ciclo de vida e o prazo de validade dos nanomateriais devem ser avaliados em relação aos impactos no meio ambiente e na saúde humana e dos animais, considerando aspectos de exposição, absorção, acumulação, liberação e deposição (Handy, 2012).

Entretanto, atualmente, não há uma legislação de regulamentação sobre o uso de nanotecnologia no setor de produtos veterinários e alimentos. No Brasil, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), juntamente com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), desempenha esse papel apenas em relação aos medicamentos já comercializados destinados aos animais, como os antimicrobianos e antiparasitários. Os testes de nanotoxicidade são necessários para avaliar o impacto dos nanomateriais nos organismos aquáticos, além de estabelecer regulamentos para seu uso seguro em água e animais (Sarkar *et al.*, 2022). Nesse sentido, políticas e diretrizes são fundamentais para o uso mais seguro e sustentável das formulações de medicamentos na aquicultura (Fajardo *et al.*, 2022).

3 CONCLUSÃO

A nanotecnologia constitui uma estratégia de grande contribuição para o desenvolvimento da aquicultura sustentável. Entre as aplicações nanotecnológicas desse setor, as formulações de medicamentos e a encapsulação de fármacos mostram um futuro promissor para a administração de produtos veterinários em rações para peixes. Atualmente, tais aplicações encontram-se em estágios iniciais de desenvolvimento, sendo que mais estudos são necessários para consolidar a sua implementação como uma importante ferramenta de controle e tratamento de doenças infecciosas e o surgimento da resistência antimicrobiana em sistemas intensivo de criação de animais.

As nanopartículas relatadas nesta revisão bibliográfica possuem potencial para serem aplicadas como sistema de entrega de medicamentos para a aquicultura em larga escala. O desenvolvimento de um sistema ideal depende das características físico-químicas do fármaco de interesse e da compatibilidade com os materiais constituintes da nanoestrutura e com o método de preparo. Além disso, essa compatibilidade também deve existir com o procedimento de produção da ração medicamentosa, seja por incorporação ou por revestimento superficial.

Os nanomateriais ainda não são totalmente compreendidos em relação aos seus efeitos e consequências indesejadas nos sistemas biológicos. A utilização da nanotecnologia para promover o desenvolvimento da aquicultura sustentável está condicionada a uma avaliação criteriosa dos potenciais riscos aos animais, aos seres humanos e ao meio ambiente. No entanto, os impactos negativos não devem constituir obstáculos ao seu desenvolvimento responsável e não devem se sobrepor aos benefícios apresentados por essa inovadora e promissora tecnologia.

REFERÊNCIAS

- AHMED, F. *et al.* Recent progress in biomedical applications of chitosan and its nanocomposites in aquaculture: A review. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 126, p. 68-82, Oct. 2019.
- ALIHOSSEINI, F. *et al.* Freeze-drying of ampicillin solid lipid nanoparticles using mannitol as cryoprotectant. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 51, n. 4, p. 797-802, Oct./Dec. 2015.
- ARAÚJO, Raquel S. **Desenvolvimento, caracterização e liofilização de nanopartículas e encapsulamento de antibiótico de uso veterinário**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.
- BAN, C. *et al.* Improving flavonoid bioaccessibility using an edible oil-based lipid nanoparticle for oral delivery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n. 21, p. 5266-5272, June 2015.
- BATISTA, C. M. *et al.* Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 167-179, abr./jun. 2007.
- BELLO, D.; LEONG, D. T. A decade of nanotoxicology: Assessing the impact on human health and the environment! **NanoImpact**, [S. l.], v. 7, p. 15-16, July 2017.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 235, p. 337-351, Aug. 2016.
- CASEWELL, M. *et al.* The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 159-161, Aug. 2003.
- CAVALLI, L. S. *et al.* (org.). **Principais doenças infecciosas em camarões e tilápias na aquicultura**. Porto Alegre: SEAPDR/DDPA, 2021.
- DANHIER, F. *et al.* PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 505-522, July 2012.
- DANIEL, P. Drugs and chemicals in aquafeeds: The problems and solutions. *In*: Rogers C.; Basurco B. (ed.). **The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture**. Zaragoza: CIHEAM, 2009. p. 85-94.
- DEZFULY, Z. T. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of *Yersinia ruckeri* lipopolysaccharide (LPS), encapsulated by alginate-chitosan micro/nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 104, p. 25-35, Sept. 2020.

DIMA, Ş.; DIMA, C.; IORDĂCHESCU, G. Encapsulation of Functional Lipophilic Food and Drug Biocomponents. **Food Engineering Reviews**, New York, v. 7, n. 4, 417-438, Dec. 2015.

DIMER, F. A. *et al.* Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

FAJARDO, C. *et al.* Nanotechnology in aquaculture: Applications, perspectives and regulatory challenges. **Aquaculture and Fisheries**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 185-200, Mar. 2022.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Towards Blue Transformation. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022.

FOGAÇA, F. O protagonismo do Brasil na produção mundial de pescado. **Embrapa**, 29 jun. 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/53738345/artigo---o-protagonismo-do-brasil-na-producao-mundial-de-pescado> Acesso em: 2 out. 2023.

FONSECA-SANTOS, B.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 10, p. 4981-5003, Aug. 2015.

GUPTA, A. *et al.* Nanoemulsions: Formation, properties and applications. **Soft Matter**, [S. l.], v. 12, p. 2826-2841, 2016.

HANDY, R. D. FSBI briefing paper: nanotechnology in fisheries and aquaculture. **Fisheries Society of the British Isles**, [S. l.], v. 1, p. 29, 2012.

HANDY, R. D. *et al.* Effects of manufactured nanomaterials on fishes: A target organ and body systems physiology approach. **Journal of Fish Biology**, [S. l.], v. 79, n. 4, p. 821-853, Oct. 2011.

HANDY, R. D.; OWEN, R.; VALSAMI-JONES, E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. **Ecotoxicology**, [S. l.], v. 17, p. 315-325, 2008.

HESSEN. Ministry of Economics, Transport, Urban and Regional Development. **Uses of Nanotechnology in Environmental Technology in Hessen**. Innovation potentials for companies. Stuttgart: Institut für Arbeitswirtschaft und Organisation, 2006. Disponível em: https://www.technologieland-hessen.de/mm/Nanoinut_Endversion_Internet_en.pdf

HILL, E. K.; LI, J. Current and future prospects for nanotechnology in animal production. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, [S. l.], v. 8, 26, Mar. 2017.

HORQUEN DA SILVA, L. *et al.* Revisão bibliográfica sobre relações entre nanomateriais, toxicidade e avaliação de riscos: a emergência da nanotoxicologia. **Disciplinarum Scientia**, Santa Maria, v. 15, n. 1, p. 19-30, 2014.

HUANG, S. *et al.* Nanotechnology in agriculture, livestock, and aquaculture in China. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 369-400, Apr. 2015.

HUIJSKENS, E. G. W. *et al.* Evaluation of Patients with Community-Acquired Pneumonia Caused by Zoonotic Pathogens in an Area with a High Density of Animal Farms. **Zoonoses and Public Health**, [S. l.], v. 63, n. 2, p. 160-166, Mar. 2016.

IWAKI, Y. O. **Eletrólitos sólidos poliméricos a base de alginato de sódio**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Instituto de Química de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

JENNINGS, S. *et al.* Aquatic food security: insights into challenges and solutions from an analysis of interactions between fisheries, aquaculture, food safety, human health, fish and human welfare, economy and environment. **Fish and Fisheries**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 893-938, Dec. 2016.

JESUS, K. R. E.; CASTRO, V. L. S. S. Nanotoxicologia aliada à avaliação de riscos ambientais: uma estratégia para avaliações de segurança das nanotecnologias no Brasil. *In*: WORKSHOP DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, 7., 2013, São Carlos. **Anais [...]**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2013. p. 525-527.

KHOSA, A.; REDDI, S.; SAHA, R. N. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 103, p. 598-613, July. 2018.

KOBASHIGAVA, R. S. **Síntese e caracterização de nanopartículas de quitosana para adsorção de metais pesados**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2021.

LIN, P. C. *et al.* Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 711-726, July. 2014.

LUIS, A. I. S. *et al.* Trends in aquaculture sciences: from now to use of nanotechnology for disease control. **Reviews in Aquaculture**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 119-132, 2019.

MACHADO, Thiago N. **Síntese, caracterização e investigação da atividade SERS de nanopartículas de metais não-convencionais**. 2021. Dissertação (Mestrado em Física e Astronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2021.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 1377-1397, Aug. 2011.

MAPA. Produtos veterinários farmacêuticos registrados no Brasil. **Ministério da Agricultura e Pecuária**, 2023. Disponível em: <https://mapa-indicadores.agricultura.gov.br/publico/single/?appid=a3e9ce67-d63b-43ff-a295-20123996ead7&sheet=4c2ec12f-be27-47f2-8136-e2fd18cbb54a&lang=pt-BR&opt=ctxmenu&select=clearall>. Acesso em: 3 out. 2023.

MASOOMI DEZFOOLI, S. *et al.* Encapsulation for delivering bioactives in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 631-660, 2019.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, [S. l.], v. 8, p. 1719-1729, Feb. 2012.

MELENDEZ-AREVALO, Arturo. **Formulação e avaliação físico-química e tecnológica de rações extrudadas para peixes**, RJ. 2019. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

MORO, G. V.; RODRIGUES, A. P. O. **Rações para organismos aquáticos**: tipos e formas de processamento. Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2015.

MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L.; BRIGIDO, R. V. Produção de alginato por microrganismos. **Polímeros**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 305-310, out. 2011.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 242, n. 1-2, p. 121-128, 2022.

MÜLLER, R. H.; SHEGOKAR, R.; KECK, C. M. 20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & NLC): Present State of Development & Industrial Applications. **Current Drug Discovery Technologies**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 207-227, Sept. 2011.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 4, p. 641-650, set. 2010.

PEIXE BR. **Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2023**: A força do peixe brasileiro. São Paulo: Associação Brasileira da Piscicultura, 2023.

QU, S. *et al.* Nanocomplexation is a promising strategy to enhance the solubility and anti-Ichthyophthirius multifiliis activity of magnolol. **Aquaculture**, [S. l.], v. 565, 739105, Feb. 2023.

QUESADA, S. P.; PASCHOAL, J. A. R.; REYES, F. G. R. Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: Special issue for fluoroquinolones-a review. **Journal of Food Science**, [S. l.], v. 78, n. 9, p. 1321-1333, Aug. 2013.

RIGOS, G.; ALEXIS, M.; NENGAS, I. Leaching, palatability and digestibility of oxytetracycline and oxolinic acid included in diets fed to seabass *Dicentrarchus labrax* L. **Aquaculture Research**, [S. l.], v. 30, n. 11-12, p. 841-847, 1999.

SAMANTA, P. *et al.* Nanoparticle nutraceuticals in aquaculture: A recent advances. **Aquaculture**, [S. l.], v. 560, 738494, Nov. 2022.

SANTOS, K. T. A. *et al.* Liposomes techniques of aerosolization for the treatment of obstructive, restrictive and infectious pulmonary diseases: a review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 12, n. 1, e16912136950, Jan. 2023.

SARKAR, B. *et al.* Nanotechnology: A next-generation tool for sustainable aquaculture. **Aquaculture**, [S. l.], v. 546, 737330, Jan. 2022.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 726-737, out. 2003.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 431-437, June 2001.

SHAH, B. R.; MRAZ, J. Advances in nanotechnology for sustainable aquaculture and fisheries. **Reviews in Aquaculture**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 925-942, May 2020.

SHAO, Y. *et al.* A systematic review on antibiotics misuse in livestock and aquaculture and regulation implications in China. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 798, 149205, Dec. 2021.

SHEN, G. Campbell biology (edited by Lisa Urry, Michael Cain, Steven Wasserman, Peter Minorsky and Jane Reece). **Journal of biological research**, Thessalon, v. 27, n. 1, 19, Dec. 2020.

SHIN, G. H.; KIM, J. T.; PARK, H. J. Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods. **Trends in Food Science and Technology**, [S. l.], v. 46, n. 1, 144157, jan. 2015.

SILVA, M. S. *et al.* Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 1868-1873, 2010.

SILVA, S. J. T. **Nanopartículas de quitosana-PEG voltadas a liberação do ácido cumárico como agente antineoplásico**. 2018. Dissertação (Mestrado em Morfotecnologia) – Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

SINGH, Y. *et al.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 252, p. 28-49, Apr. 2017.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, São Carlos, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

WOAH. One Health. **World Organisation for Animal Health**, c2023. Disponível em: <https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/one-health/>. Acesso em: 5 out. 2023.