



## BIODISTRIBUIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA EM GLÂNDULA MAMÁRIA CAPRINA

ANDRADE, P. V. D.<sup>1,2</sup>; BRANDI, R. R.<sup>2,3</sup>; DA SILVA, S. R.<sup>2,3</sup>; GUIMARÃES, A. S.<sup>2</sup>; LANGE, C.C.<sup>2</sup>; GERN, J. C.<sup>2</sup>; BRANDÃO, H. M.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, MG

<sup>2</sup> Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil

\*e-mail de contato; [humberto@cnppl.embrapa.br](mailto:humberto@cnppl.embrapa.br)

Projeto Componente: PC5

Plano de Ação: PA 2 e PA6

### Resumo

Os tratamentos para mastite caprina nem sempre são bem sucedidos e novas terapias devem ser testadas afim de melhorar o controle dessa afecção, que altera a composição do leite e diminui a sua qualidade. Nesse estudo avaliamos o tecido glandular de cabras em lactação com o objetivo de verificar a biodistribuição de nanopartículas de quitosana. Glândulas mamárias de quatro cabras em lactação foram retiradas 48h após a administração intramamária de uma solução contendo nanopartículas de quitosana marcadas com fluoresceína. Foram realizados cortes histológicos das glândulas para observação da presença de fluorescência, o que é um indicativo da presença da nanopartícula. Os resultados mostraram uma ampla distribuição da fluorescência tanto nos tecidos normais como naqueles com processo infeccioso, indicando que as nanopartículas se difundiram por todo o tecido mamário, atingindo áreas mais dorsais da glândula e o interior de abscessos. Isso mostra que 48h após a aplicação, as nanopartículas se difundiram por todo o tecido mamário e podem, potencialmente, ser utilizadas em formulações intramamárias para essa espécie.

**Palavras-chave:** Mastite, Caprino, Biodistribuição, Nanopartículas.

### Introdução

A mamite é um dos principais fatores que interferem na composição do leite. Infecções intramamárias provocam diminuição na produção de leite e promovem grandes aumentos da contagem de células somáticas e da concentração de compostos originados do plasma sanguíneo no leite (ácidos graxos livres, cloretos e proteínas plasmáticas), além da diminuição de produtos sintetizados pela própria glândula, principalmente caseínas e lactose [1]. Essas alterações diminuem a qualidade do leite caprino como alimento e como matéria prima para a indústria de lácteos, causando grandes prejuízos para a cadeia produtiva e riscos para a saúde pública.

Em rebanhos caprinos, entre os principais agentes isolados em leite oriundos de animais com infecções intramamárias estão o *Streptococcus agalactiae* e o *Staphylococcus aureus* [2], mas muitos outros agentes podem também estar envolvidos, como estafilococos coagulase negativa, micoplasmas e até agentes ambientais, como coliformes [3] o provocadas pelo *S. aureus*, estreptococos, enterobactérias e *Actinomyces pyogenes* [2].

Animais que apresentam mamite aguda devem ser tratados com rapidez para evitar a perda da capacidade funcional da glândula afetada e até a morte do animal. Contudo, alguns autores não recomendam o tratamento da mastite subclínica em

SP 5757  
P. 186

caprinos, pois o tratamento muitas vezes não alcança o sucesso esperado [4] e o problema torna-se crônico, com recidivas frequentes.

Novas terapias tem sido desenvolvidos para prevenir e tratar as mamites bovinas e é possível que essas terapias também possam ser usadas no tratamento e controle de infecções intra-mamárias em caprinos. Nesse estudo, o objetivo foi avaliar, em glândulas mamárias de cabras em lactação, a distribuição de nanopartículas com potencial uso para carreador de antibióticos em tecido sadio ou com infecção natural.

### Material e métodos

A quitosana complexada com a fluoresceína isotiocianato (FITC) foi obtida a partir de 100 mg de FITC solubilizada em 150 mL de metanol desidratado ao qual foi adicionado 100 mL de quitosana a 1% em 0,1 M CH<sub>3</sub>COOH. Após três horas de reação em ambiente escuro, a quitosana foi precipitada por elevação do pH. Para remoção de FITC livre, o precipitado foi submetido a ciclos repetidos de lavagem e centrifugação (40.000 G durante 10 min) até que a ausência de fluorescência no sobrenadante (NanoDrop Spectrometer Thermo Scientific). A quitosana-FITC após solubilização em 80 mL de 0,1 M CH<sub>3</sub>COOH foi então dialisada durante três dias em ambiente escuro sobre 5L de água destilada na água destilada, com água substituída diariamente [5].

As nanopartículas foram preparadas pelo método de Geleificação Ionotrópica. Para isso, seguiu-se a proporção de 2 mL de uma solução de TPP contendo cloreto de sódio em 4 mL de uma solução de quitosana (4 mg/mL, Ácido Acético 1%) sob agitação magnética [6,7]. Em seguida as nanopartículas foram secas por liofilização e, posteriormente caracterizadas através do tamanho de partícula e potencial zeta (Zetasizer NANO ZS, Malvern Instruments Limited).

A parte animal foi conduzida com quatro cabras multíparas em lactação. O estado sanitário de cada antímero mamário foi determinado por intermédio de isolamentos bacteriano em duplicata [8,9].

Uma cabra sã não recebeu nenhum tipo de tratamento (controle negativo), enquanto que as demais receberam, nas duas glândulas, uma injeção intramamária de 300 mg de nanopartículas de quitosana-FITC.

Os animais foram abatidos 48h após a aplicação de nanopartículas para retirada da glândula mamária. Amostras de tecido glandular foram coletadas 5, 10 e 15cm a partir da base do teto para o preparo de cortes histológicos em um micrótomo

de congelamento (HYRAX-25, Carl Zeiss) e subsequente avaliação de fluorescência por microscopia (Axioplan I Carl Zeiss).

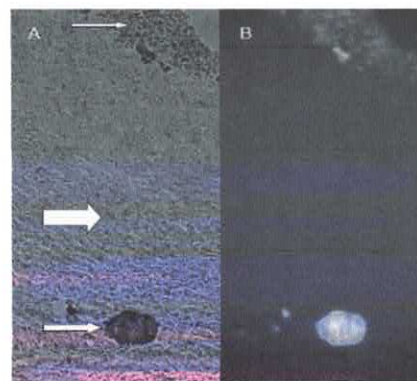
### Resultados e discussão

As nanopartículas de quitosana apresentaram-se catiônicas, com potencial Zeta +23,5 mV, em pH 7,2. O tamanho médio das partículas foi de 220,2 nm.

Nos antímeros mamários infectados foram isolados *Actinomyces pyogenes* (01), *Staphylococcus coagulase negativo* (02) e *Staphylococcus aureus* (01). Os demais antímeros estavam saudáveis.

Qualitativamente, foi identificado que as nanopartículas catiônicas se distribuíram até as partes dorsais das glândulas mamárias, tanto em glândulas saudáveis quanto nas infectadas, sendo evidenciada pelo aumento da fluorescência, principalmente nos ductos glandulares.

Na fig. 1, obtida por microscopia, podemos observar um abscesso no ápice glandular, causado por *A. pyogenes*. No campo claro (fig. 1 A), estão evidenciados um ducto galactóforo (seta de espessura intermediária), tecido conjuntivo fibroso (seta grossa) e extenso infiltrado inflamatório (seta fina). Quando exposto à fluorescência, observa-se marcante fluorescência no ducto galactóforo e na região rica em infiltrado inflamatório (fig. 1 B).



**Figura 1** A. Microscopia de campo claro de microabscesso glandular, B. Microscopia de fluorescência de microabscesso glandular.

A elevada intensidade de fluorescência no ducto galactóforo justifica-se por esta estrutura estar intimamente ligada à cisterna glandular, local de deposição das nanopartículas. Abscessos por serem revestidos de tecido conjuntivo e possuírem rico infiltrado inflamatório dificultam a elevação da concentração de antibiótico nesse compartimento [10]. A elevada fluorescência na região rica em células inflamatórias indica o direcionamento das

nanopartículas para esse compartimento biológico, o que pode ser justificado pelo caráter catiônico da nanopartícula, que favorece sua fagocitose [11].

---

### Conclusões

---

Nanopartículas de quitosana apresentam biodistribuição semelhante, tanto em glândulas saudáveis quanto em glândulas com mastite. Adicionalmente foi identificado o direcionamento das nanopartículas para regiões onde normalmente antibióticos convencionais possuem acesso limitado, o que pode favorecer seu uso como carreador de fármacos para o tratamento da mastite.

---

### Agradecimentos

---

À EMBRAPA, Rede AgroNano, FAPEMIG e Rede NAOBIOMG, CAPES, FINEP, CNPq.

---

### Referências

---

1. N.K. Mungatana; R.N. Ngure; A. Shitandi; B. Onyiego; M. Mutumba *J. Dairy Tech.* 2011, 64, 360.
2. K. Raynal-Ljutovac; A. Pirisi; R. Crémoux; C. Gonzalo *Small Rum. Res.* 2007, 126.
3. R. A. Mota *Tecnol. Cienc. Agrop.* 2008, 2, 57.
4. C. Gonzalo *Production and utilization of ewe and goat milk.* Proceedings of the IDF. International Dairy Federation, 1995, 59.
5. Z. Ma; L-Y. Lim *Pharmac. Res.* 2003, 20, 71.
6. Z. Ma; T. M. Lim *Intern. J. Pharm.* 2005, 2, 271.
7. B. Sarmento; D. Ferreira; F. Veiga; A. Ribeiro *Carbohydr. Polym.* 2006, 66, 1.
8. NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Wayne: NCCLS, Document M31-T, 1997, 64.
9. M. A. V. P. Brito; J. R. F. Brito; M. A. S. Silva; R. A. Carmo *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 2001, 53, 531.
10. H.W. Barkema; Y.H. Schukken; R.N. Zadoks *J. Dairy Sc.* 2006, 89, 1877.
11. C. P. Reis; R. J. Neufeld; A. J. Ribeiro; F. Veiga, *Nanomed- Nanotech.* 2006, 2, 8.