



AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO DE NANOCÁPSULAS EM GLÂNDULA MAMÁRIA BOVINA *EX SITU*

CASTANHEIRA, R. G.¹; BRANDI, R. R.^{2,3}; MOSQUEIRA, V. C. F.¹; DA SILVA, S. R.^{2,3}; GERN, J. C.²; ANDRADE, P. V. D.⁴; BRANDÃO, H. M.^{2*}

¹ Universidade Federal de Ouro Preto, MG, Brasil

² Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil

³ Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil

⁴ Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, MG

*e-mail de contato; humberto@cnppl.embrapa.br

Projeto Componente: PC5

Plano de Ação: PA6 e PA 2

Resumo

A determinação da biodistribuição de formulações farmacêuticas é importante para assegurar que o fármaco atinja todo o tecido a ser tratado. Estudos recentes demonstraram que glândulas mamárias *ex situ* podem ser utilizadas para avaliação da biodistribuição de formulações intramamárias. Neste contexto, nossa equipe utilizou este modelo para avaliar a biodistribuição de nanocápsulas contendo cloxacilina. Pode-se observar presença de nanocápsulas no dorso das glândulas, a 15 cm da base do teto, o que demonstra que as nanocápsulas potencialmente podem se difundir por toda a glândula.

Palavras-chave: Nanocapsula, biodistribuição, glândula mamária

Introdução

A biodistribuição de fármacos em modelos experimentais *ex situ* vem sendo utilizados como alternativa ao uso de animais. Isso se deve à crescente preocupação com a ética e bem estar animal [1].

Kietzmann e Ehinger [2] demonstraram a viabilidade de uso de glândulas mamárias *ex situ* para estudos de cinética de difusão de antibióticos em bovinos. Para tanto, esses autores avaliaram a biodistribuição tecidual da penicilina benzatínica após sua administração pela via intramamária. Em outros trabalhos, o mesmo grupo [3,4,5], utilizou o mesmo modelo para avaliar a biodistribuição

tecidual de outros antibióticos, como por exemplo da cloxacilina, cefquinome, oxacilina e ampicilina.

O uso de nanocarreadores, mais recentemente, vem sendo uma estratégia para promover melhorias na antibioticoterapia, basicamente por promover liberação sustentada, reduzir a toxicidade ou direcionar o fármaco para compartimentos biológicos específicos.

Neste contexto, nossa equipe desenvolveu uma formulação composta de nanocápsulas, capaz de direcionar o antibiótico para o interior de polimorfonucleares (PMN) e, com isso melhorar os índices de cura nos casos de mastite causados por patógenos resistentes à fagocitose.

Todavia ao ser nanoencapsulado, o antibiótico, pode ter sua biodistribuição modificada, existindo a possibilidade, portanto, das nanocápsulas não atingirem as partes superiores da glândula mamária. Logo, o presente projeto tem por objetivo avaliar a biodistribuição de nanocápsulas em modelos de glândula mamária bovina *ex situ*.

Materiais e métodos

Nanocápsulas contendo cloxacilina foram preparadas pela técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado, seguida de evaporação do solvente, observando detalhes de metodologia previamente descrita por Mosqueira e colaboradores [6]. Entretanto, em substituição à quitosana convencional foi utilizada quitosana conjugada à fluoresceína isotiocianato (FITC), para tanto 100mg de FITC foram adicionadas a 150 mL de metanol desidratado foram adicionados a 100 mL de quitosana a 1% em 0,1 M CH₃COOH. Após três horas de reação em ambiente escuro, a quitosana marcada com FITC, foi precipitada por elevação do pH. Para remoção da FITC livre, o precipitado foi submetido a ciclos repetidos de lavagem e centrifugação (40.000 G durante 10 min) até que a não fluorescência foi detectada no sobrenadante (NanoDrop Spectrometer Thermo Scientific).

O tamanho médio e índice de polidispersão (IPD) das partículas foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons a 20°C em um Nanosizer N5Plus Analyser, Beckmann Coulter (Fullerton, USA), enquanto que o potencial Zeta foi determinado por anemometria laser Doppler em um Zetasizer HS3000 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

Quatro glândulas mamárias de fêmeas bovinas da raça girolanda foram coletadas na linha de abate do abatedouro FRIPAI. Após a remoção da glândula, canulou-se a artéria pudenda externa de cada antímero do úbere, os quais foram perfundidos com 1L de citrato de sódio 0,9% (p/v) resfriados e conduzidos ao laboratório.

Seguindo procedimentos previamente descritos por Kietzmann e Ehinger [2], as glândulas foram mantidas mimetizando a posição animal ortostática e viabilidade tecidual por seis horas foi conseguida por intermédio da perfusão de 120ml/min de solução de Tyrodí, previamente aquecida à 41°C e oxigenada com Carbogen. Em cada quarto mamário foi injetado 600mg de cloxacilina nanoencapsulada e, ao término de seis horas, amostras de tecido 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 nanocápsulas contendo cloxacilina utilizadas para produzir a formulação intramamária apresentaram diâmetro médio de 322nm, IPD de 0,088 e potencial Zeta estimado em -28mV.

Na fig. 1A pode-se observar discreta autofluorescência em um corte histológico de glândula mamária a 10 cm da base do teto sem o tratamento com nanocápsulas. A fig. 1B, representa um corte histológico distante cinco centímetros da base do teto de um quarto mamário que recebeu o tratamento. Neste, podemos observar grande quantidade de ductos galactóforos com intensa fluorescência (setas). À medida que aprofundamos no tecido glandular, fig. 1C e 1D, respectivamente 10 e 15cm distantes da base do teto, identificamos ductos galactóforos superiores, observados na imagem com intensa fluorescência.

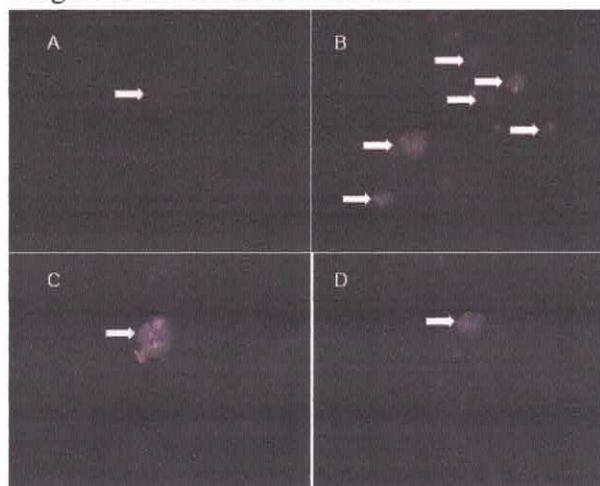


Figura 1. A. Microscopia de fluorescência de glândula mamária distante da base do teto 10 cm, grupo controle. B. Microscopia de fluorescência de glândula mamária tratada com 600mg de cloxacilina nanoencapsulada distante da base do teto 5 cm. C. Microscopia de fluorescência de glândula mamária tratada com 600mg de cloxacilina nanoencapsulada distante da base do teto 10 cm. D. Microscopia de fluorescência de glândula mamária tratada com 600mg de cloxacilina nanoencapsulada distante da base do teto 15 cm. As setas indicam ductos galactóforos.

A glândula mamária bovina é composta por grande quantidade de ácinos glandulares,

responsáveis pela produção de leite. Este é drenado para a cisterna do teto por intermédio de uma vasta rede de ductos galactóforos que se ramificam pelo parênquima até os ácinos glandulares e acabam por coalescer na cisterna do teto. Quando administrado pela via intramamária, um antibiótico faz exatamente o caminho inverso do leite, preenchendo primeiramente a cisterna, ganhando na sequência o espaço interno dos ductos galactóforos inferiores e superiores, para só então atingir os ácinos glandulares. Como demonstrado, em apenas seis horas após administração, as nanocápsulas já atingiram a região mais distal da glândula mamária, indicando sua rápida e boa biodistribuição tecidual.

Conclusões

Em um curto espaço de tempo as nanocápsulas atingiram o ápice dos ductos galactóforos, demonstrando que não houve acúmulo na cisterna. Estes resultados indicam boa biodistribuição tecidual, um dos pré-requisitos para formulações intramamárias.

Agradecimentos

EMBRAPA, CNPq, FINEP, CAPES, Rede Agronano,⁴ FAPEMIG, Rede Nanobiomg, Frigorífico FRIPAI e seus funcionários por gentilmente doar as glândulas mamárias.

Referências

1. R. L. Paixão *CFMV* 2007, 42, 66.
2. A. M. Ehinger; M. Kietzmann *J. vet. Pharmacol. Therap* 2000, 23, 303.
3. M. Kietzmann; F. Niedorf; J. Gossellin, *BMC Vet. Res.* 2010, 6, 1.
4. A. M. Ehinger; H. Schmidt; M. Kietzmann *Vet. J.* 2006, 172, 147.
5. A. M. Ehinger; M. Kietzmann *J. Vet. Med* 2000, 47, 157.
6. V. C. F. Mosqueira; R. S. Araújo; H. M. Brandão, U.S. Patent WO 2011150481, 2011.