

AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MUCOADESIVAS EM BRÂNQUIAS DE TAMBAQUIS AMAZÔNICOS

Ana Carolina da Silva Costa¹, Alexandra Regina Bentes de Sousa², Eraldo José M. Tavares³, Humberto Brandão de Sousa⁴, Edilson Rodrigues Matos⁵, Marly Fátima C. Melo⁶; João de Jesus Viana Pinheiro⁷, José Otávio Carrera Silva Junior⁸, Roseane Maria Ribeiro Costa⁹

^{1,6,7,8,9} Universidade Federal do Pará, anaccosta@ufpa.br; mfcem@ufpa.br, joaopinheiro@ufpa, carrera@ufpa.br, rmrc@ufpa.br

^{2,3} Embrapa Amazônia Oriental, alexabentes@cpatu.embrapa.br; eraldojo@cpatu.embrapa.br.

⁴ Embrapa Gado de Leite, humberto@cnppl.embrapa.br

⁵ Universidade Federal Rural da Amazônia, edilson.matos@ufrpa.edu.br

Projeto Componente: PC5

Plano de Ação: PA2

RESUMO

O Tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe de água doce com grande potencial econômico para o agronegócio amazônico. O objetivo desse trabalho foi analisar a incorporação de nanopartículas de quitosana marcadas com FITC (Fluoresceína Isotiocianato) em tecido branquial de tambaquis amazônicos. Nanopartículas de quitosana- FITC foram preparadas pelo método de Geleificação Ionotrópica e usadas em banhos a alevinos de tambaquis durante 30 minutos. Observou-se por microscopia de fluorescência a incorporação nanopartículas de quitosana- FITC em tecido animal, sugerindo este sistema como um potencial veículo para a liberação controlada de fármacos em tecidos branquiais.

Palavras-chave: Tambaquis, Nanopartículas, Quitosana, FITC.

INTRODUÇÃO

A fauna de peixes de água doce do Brasil é a mais rica do mundo, com cerca de 2.587 espécies [1]. Segundo dados do Ministério de Pesca e Aquicultura, o Brasil gera um PIB pesqueiro de R\$ 5 bilhões com potencial para se tornar um dos maiores produtores mundiais de pescado [2]. Dentre os peixes de grande interesse econômico para o agronegócio amazônico, o Tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Cuvier, 1818), destaca-se com grande potencial devido a sua adaptabilidade ao ambiente de cultivo, bom crescimento alcançado, alta produtividade, resistência a baixos índices de oxigênio dissolvido, além da palatabilidade da carne e valor comercial alcançado, entretanto, as enfermidades ocasionadas pelos patógenos desses organismos aquáticos podem comprometer e inviabilizar sua produção comercial [3,4].

Em face a esse aumento significativo da aquicultura no país, a valorização de tecnologias para a sanidade em peixes torna-se importante ferramenta para a minimização das perdas econômicas substanciais geradas com a evolução

das enfermidades [5,6]. Sistemas poliméricos de liberação de fármacos são largamente utilizados e não só permitem uma liberação lenta e gradual do princípio ativo, como também possibilitam o direcionamento a alvos específicos do organismo [7]. A quitosana é um biopolímero natural derivado da quitina e tem se tornado muito atraente em medicina veterinária, sua utilização como veículo de liberação de fármacos é devida as suas características de atoxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e mucoadesão, propiciada pelo grande número de grupos hidroxila e grupos amino presentes em sua cadeia polimérica, que realçam suas propriedades de permeação [8,9].

O objetivo desse trabalho foi avaliar a incorporação de nanopartículas fluorescentes em tecido de Tambaquis Amazônicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Quitosana (MM=7,1 K Da, grau de desacetilação 97%), obtida pela SIGMA[®];

Tripolifosfato de sódio (TPP) obtida pela SIGMA[®], FITIC (Fluoresceína Isotiocianato), ácido acético, metanol desidratado, etanol, hidróxido de sódio.

Preparação das Nanopartículas de Quitosana Marcadas com FITC e Caracterização

Uma quantidade 100 mg de FITC somada a 150 mL de metanol desidratado foram adicionados a 100 mL de quitosana a 1% em 0,1 M CH₃COOH. Depois de 3 horas de reação em ambiente escuro, a quitosana marcada com FITC, foi precipitado por elevação do pH de 8 a 9 com 0,5 M NaOH. Para remoção de FITC não conjugada, 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. A quitosana-FITC dissolvido em 80 mL de 0,1 M CH₃COOH foi então dialisada durante 3 dias em ambiente escuro sobre 5L de água destilada na água destilada, com água substituída diariamente [10].

As nanopartículas foram preparadas pelo método de Geleificação Ionotrópica. Para isso, 2 mL de uma solução de TPP contendo cloreto de sódio, foi gotejado em 4 mL de uma solução de quitosana (4 mg/mL, Ácido Acético 1%) sob agitação magnética [11,12]. 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).

Ensaio de nanopartículas de quitosana marcadas com FITC em tecido de Tambaquis

O estudo foi realizado na Estação de Piscicultura da Embrapa Amazônia Oriental do Estado do Pará durante o mês de janeiro de 2012. Foram usados alevinos de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) previamente medidos. Para os ensaios, os tambaquis foram aclimatados por um período de 72 horas antes do início dos experimentos. Em cada tanque foram colocados (n=07) tambaquis, distribuídos no grupo submetido ao banho de nanopartículas de quitosana-FITC ressuspendidas em água durante o período de exposição de 30 minutos e o grupo controle. A alimentação dos animais foi suspensa 24 horas antes do início do teste e durante os mesmos. Os parâmetros físico-químicos das unidades experimentais, como temperatura e pH foram monitorados antes da execução do experimento.

A preparação histológica foi realizada no Laboratório de Pesquisa Dr. Carlos Azevedo/UFRA. Após a analgesia com água gelada, os peixes foram sacrificados através da secção da medula espinhal. A necropsia foi realizada com remoção dos arcos branquiais com fixação do material em solução de formalina tamponada a 10 % e processamento rotineiro para histologia. Posteriormente foram preparados os cortes histológicos em lâminas e encaminhadas à microscopia de fluorescência/UFPA, a fim de verificar a presença de nanopartículas de quitosana aderidas aos tecidos branquiais de tambaquis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As nanopartículas de quitosana-FITC apresentaram tamanho de partícula com valor predominante de 220,2 nm. Na avaliação do potencial zeta, o valor encontrado foi de + 23,5 mV em pH de 7,2 dessa forma, sua carga superficial é positiva devido a natureza catiônica dos grupos amino presentes na cadeia polimérica da quitosana. O sistema apresenta estabilidade comprovada, uma vez que o valor do potencial zeta de um sistema de natureza estável eletrostaticamente apresenta valor (em módulo) maior que 20 mV [13].

Os parâmetros de qualidade da água do tanque dos peixes encontrados mostraram-se dentro da faixa de recomendações técnicas [14], com temperatura da água em 25,3°C e pH igual a 6,7 e peixes de tamanho médio de 5 cm.

As análises da microscopia de fluorescência do tecido branquial demonstraram pontos com maior incidência de fluorescência ao longo de toda sua superfície externa. A quitosana exibe comportamento biológico favorável, tais como mucoadesão e permeabilidade permitindo a impregnação das nanopartículas marcadas com FITC nessa região (Fig. 1), fato não observado no tecido branquial do grupo controle (Fig. 2) não submetido à exposição com nanopartículas de quitosana-FITC. Isso sugere a possibilidade de utilização destas partículas como veículo de liberação controlada de fármacos em brânquias.

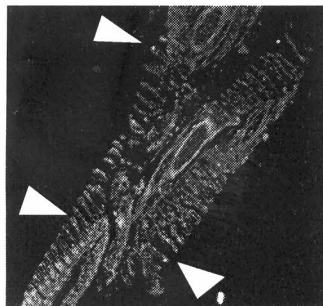


Fig.1. Seção transversal de filamento branquial de tambaquis submetido a banho de 30 minutos de nanopartículas de quitosana-FITC; objetiva 10 X.

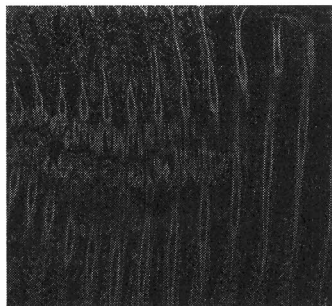


Fig.2. Seção longitudinal de filamento branquial de tambaquis, grupo controle; objetiva 10 X.

CONCLUSOES

A quitosana é um biopolímero, biodegradável não tóxico que pode ser usado na aquicultura. Os resultados preliminares obtidos sugerem que é possível realizar banhos de nanopartículas de quitosana como veículo de liberação de fármacos com a finalidade terapêutica para a sanidade de tambaquis amazônicos. Além disso, a adoção de sistema de liberação controlada pode contribuir para facilitar o manejo do animal, com redução do estresse em ambiente de cultivo, fator que predispõe a queda de imunidade e susceptibilidade de peixes a enfermidades.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e CNPq pelo apoio financeiro, a EMBRAPA e a Rede Agronano pela colaboração para a conclusão das análises.

REFERÊNCIAS

- 1 H.P, Godinho. *Rev Bras Reprod Animal*, 2007, 31, 351-360.
- 2 BRASIL, Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca. Mais Pesca e Mais Aquicultura, Plano de desenvolvimento sustentável- Uma rede de ações para o fortalecimento do setor. Brasília, 2011.
- 3 R. Sens. Msc. Universidade Federal do Tocantins, 2009.
- 4 M, Tavares-dias, Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá:Embrapa Amapá, 2009.
- 5 J.L, Luque in anais do 13º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, 2004.
- 6 I. A, Pizzolatt, Especialização. Universidade do Estado de Santa Catarina, 2000.

- 7 C.E, Soma, C. Dubernet, D. Bentolila, S. Benita & P. Couvreur. *Biomaterials*, 2000, 21, 1-7.
- 8 KUMAR, S. R; AHMED, V.P; ISHAQ, V. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25, 47- 56.
- 9 M, Günbeyaza ; A, Faraji; A, Özkul; N, Purali ; S, Sevda,. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 41, 531–545.
- 10 Z, Ma; L-Y. Lim. *Pharmaceutical Research*, 2003, 20, 11
- 11 Z, Ma ; T, Lim et al. . *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, p. 271-280.
- 12 Sarmento, B. et al. *Carbohydrate Polymers*, 2006, v. 66, p. 1-7.
- 13 M.R. Moura. Dsc., Universidade Federal de São Carlos, 2009.
- 14 MINISTERIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. EMBRAPA- Amazônia Oriental. Parâmetros ambientais e qualidade da água na piscicultura, 2000.