

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

Farmacocinética de nanopartículas de cloxacilina administradas em caprinos diagnosticados com linfadenite caseosa¹

Isabella Bitencourt Guimarães², João Vitor Fernandes Cotrim de Almeida³, Joelma Vianello⁴, Bruna Gazolla Batalha⁵, Marcos Ferrante⁶, Michelle Daiane de Almeida Loures⁷, Juliana Carine Gern⁸, Patrícia Yoshida Faciolli-Martins⁸, Alessandro de Sá Guimarães⁸, Humberto de Mello Brandão^{8,9}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq. (a) Interpolação dos processos n° 424658/2016-0 e 448011/2014-0, liderado por Humberto de Mello Brandão; (b) Parte da tese de Dissertação de mestrado, financiada pela Capes, Fapemig e SEG 0315.00.057.00.00.

²Graduanda em Medicina Veterinária da UFJF (Juiz de Fora - MG), e Bolsista do CNPq. e-mail: citguimaraes@gmail.com

³Mestrando em Ciências Veterinárias da UFLA (Lavras - MG). e-mail: joavcotrim@gmail.com

⁴Graduanda em Biomedicina da UNIPAC (Juiz de Fora - MG). e-mail: joelmavianello95@outlook.com

⁵Graduanda em Biomedicina da UNIPAC (Juiz de Fora - MG). e-mail: brunagazollabatalha@yahoo.com.br

⁶Professor da UFLA (Lavras - MG). e-mail: marcosferrante@gmail.com

⁷Analista do Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora - MG). e-mail: michelle.loures@embrapa.br

⁸Pesquisador, Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora - MG). e-mail: juliana.gern@embrapa.br

⁸Pesquisador, Embrapa Caprinos e Ovinos (Sobral - CE). e-mail: patricia.yoshida@embrapa.br

⁸Pesquisador, Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora - MG). e-mail: humberto.brandao@embrapa.br

⁹Orientador

Resumo: A linfadenite caseosa, é uma doença causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, e afeta pequenos ruminantes em todo o mundo, reduzindo significativamente a produção de leite, lã e carne. As lesões encapsuladas nos linfonodos superficiais são a barreira para a penetração de antibióticos no local da infecção. Portanto, os objetivos deste estudo foram avaliar a taxa de penetração farmacocinética no abscesso de nanoesferas poliméricas carregadas com cloxacilina em cabras infectadas. **Material e Métodos:** Foi preparada uma solução de cloxacilina sódica, produzida pela técnica de polimerização interfacial PCL. A formulação nanoparticulada foi caracterizada por técnicas de Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) e Microscopia de Força Atômica (AFM). Foram utilizadas 8 fêmeas da raça Toggenburg, distribuídas em 3 grupos, de acordo com o tempo de drenagem do conteúdo de abscesso após administração subcutânea da formulação. A atividade antibacteriana foi determinada por testes *in vitro* de cultura de macrófagos. A quantificação da cloxacilina foi realizada por espectrometria de massas tipo triplo quadrupolo (Waters, Inglaterra). **Resultados e Discussão:** A taxa mais elevada de inibição bacteriana no compartimento intracelular sugere a entrega de cloxacilina às células fagocitárias. Subsequentemente à administração de dose única, considerando a concentração no plasma e abscesso, uma retenção crescente do antibiótico pode ser identificada nos abscessos durante o período da experiência. A concentração de cloxacilina no abscesso foi muito maior do que a concentração inibitória *in vitro*, mesmo após o antibiótico não ser mais detectado no sistema circulatório. **Conclusões:** A concentração de cloxacilina no abscesso foi muito maior do que a concentração *in vitro*, mesmo após esse não ser mais detectado no sistema circulatório. Os dados são promissores para o desenvolvimento de uma abordagem eficaz para o tratamento com cloxacilina.

Palavras-chave: cloxacilina, espectrometria de massas, linfadenite caseosa

Pharmacokinetics of cloxacillin polymeric nanoparticles administered in goats diagnosed with caseous lymphadenitis.

Summary: Caseous lymphadenitis, a disease caused by the bacterium *Corynebacterium pseudotuberculosis*, affects small ruminants around the world, significantly reducing milk, wool and meat production. The lesions encapsulated in the superficial lymph nodes are the barrier to the penetration of

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

antibiotics at the site of infection. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the rate of pharmacokinetic in the abscess penetration of polymeric nanospheres loaded with cloxacillin in infected goats. **Material and Methods:** A solution of sodium cloxacillin, produced by the PCL interfacial polymerization technique, was prepared. Nanoformulation was characterized by Dynamic Light Dispersion (DLS) and Atomic Force Microscopy (AFM) techniques. Eight Toggenburg females were used, distributed in 3 groups, according to the drainage time of the abscess content after subcutaneous administration of the formulation. Antibacterial activity was determined by in vitro macrophage culture tests. Cloxacillin quantification was performed by triple quadrupole mass spectrometry (Waters, England). **Results and Discussion:** The highest rate of bacterial inhibition in the intracellular compartment suggests the delivery of cloxacillin to phagocytic cells. Subsequent to single dose administration, considering plasma concentration and abscess, increased retention of the antibiotic can be identified in the abscesses during the period of the experiment. The concentration of cloxacillin in the abscess was much higher than the inhibitory concentration in vitro, even after the antibiotic was no longer detected in the circulatory system. **Conclusions:** The concentration of cloxacillin in the abscess was much higher than the concentration in vitro, even after it was no longer detected in the circulatory system. The data are promising for the development of an effective approach to treatment with cloxacillin.

Key words: cloxacillin, mass spectrometry, caseous lymphadenitis

Introdução

A linfadenite caseosa é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* que afeta pequenos ruminantes em todo o mundo, reduzindo significativamente a produção de leite, lã e carne e, em casos extremos causando a morte do animal. As lesões encapsuladas nos linfonodos superficiais são a barreira para a penetração de antibióticos no local da infecção. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a taxa de penetração do fármaco no interior do abscesso e definir a farmacocinética de uma formulação farmacêutica nanoestruturada contendo cloxacilina em cabras naturalmente infectadas.

Material e Métodos

A cloxacilina nanoencapsulada (NPCLX) foi produzida pela técnica de polimerização interfacial do PCL. A formulação nanoestruturada foi preparada com 700 mg de polímero, 140 mg do antibiótico, 1,24 ml de surfactante, 140 ml de acetona, 60 ml de metanol e 460 ml de água destilada seguindo procedimentos previamente estabelecidos na patente WO/2011/150481. A NPCLX foi caracterizada por técnicas de Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) e Microscopia de Força Atômica (AFM) [1]. A definição da dose efetiva de NPCLX foi realizada *in vitro*, pela técnica de co-cultivo de macrófagos periféricos com *C. pseudotuberculosis* e NPCLX em distintas concentrações [2]. Um total de 08 cabras Toggenburg foram distribuídas em três grupos, de acordo com o tempo de drenagem do conteúdo de abscesso: 3, 6 e 24 h após a administração subcutânea de 1,81 mg/kg da CLX na região do linfonodo regional. A antisepsia foi feita com tintura de iodo a 10% e álcool 70%. O sangue para estudos de farmacocinética foi colhido nos tempos 0,25, 0,5, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas pós aplicação do fármaco. A concentração plasmática e intra abscesso de cloxacilina (CLX) foi determinada por espectrometria de massa Tandem acoplada a UPLC (Waters, USA).

Resultados e Discussão

A NPCLX exibiu tamanhos de $188,41 \pm 49,34$ nm, índice de polidispersão (IPD) de $0,181 \pm 0,07$ e potencial Zeta de $-33,93 \pm 6,42$ mV. Pela técnica AFM, as NPCLX apresentaram forma esférica e tamanho semelhante ao resultado da análise DLS. Para 4 µg/mL houve uma redução de 96,5 e 89% na contagem bacteriana nos ensaios de atividade antibacteriana *in vitro* do compartimento intracelular e extracelular, respectivamente. No plasma, a meia vida foi de 3,2 h, a concentração máxima foi de 8312,9 ng/mL, o tempo de pico de concentração foi de 0,3 h e a área sob a curva (AUC_{0-t}) 22089 ng-hr/mL. Para o abscesso, a C_{max} prevista foi de 177480 ng/mL, a T_{max} prevista foi de 24 h e a AUC_{0-t} foi de 587886,6 ng-h/mL [3, 4].

XXIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 11 de julho de 2019

Conclusão

A taxa mais elevada de inibição bacteriana no compartimento intracelular sugere o direcionamento de cloxacilina às células fagocitárias. Subsequentemente à administração de dose única, considerando a concentração no plasma e abscesso, uma retenção crescente do antibiótico pode ser identificada nos abscessos durante o período de avaliação. A concentração de cloxacilina no abscesso foi muito maior do que a concentração inibitória *in vitro*, mesmo após o antibiótico ser depurado do sistema circulatório. Os dados são promissores para o desenvolvimento de uma abordagem terapêutica mais eficaz para o tratamento da linfadenite caseosa.

Referências

- [1] ARAÚJO et al. Mater. Sci. Eng. C. 2019; **Accepted paper**.
- [2] SAUERMAN, R.; KARCH, R.; LANGENBERGER, H.; KETTENBACH, J.; MAYER-HELM, B.; PETSCH, M.; WAGNER, C.; SAUTNER, T.; GATTRINGER, R.; KARANIKAS, G.; JOUKHADAR, C. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 2005; 49, p. 4448-4454.
- [3] MOHAMED, M. M.; FOUAD, S. A.; ELSHOKY, H. A.; MOHAMMED, G. M.; SALAHELDIN, T. A. **Int. J. Vet. Sci. Med.**, 2017, 5, p. 23-29.
- [4] SANTOS, L. M.; STANISIC, D.; MENEZES, U. J.; MENDONÇA, M. A.; BARRAL, T. D.; SEYFFERT, N.; AZEVEDO, V.; DURÁN, N.; MEYER, R.; TASIC, L.; PORTELA, R. W. **Front. Microb.**, 2019, 10, p. 824.