



JOÃO VITOR FERNANDES COTRIM DE ALMEIDA

**ESTUDO FARMACOCINÉTICO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
DE CLOXACILINA ADMINISTRADAS EM CABRAS TOGGENBURG
NATURALMENTE INFECTADAS POR *CORYNEBACTERIUM*
*PSEUDOTUBERCULOSIS***

Lavras - MG

2019

JOÃO VITOR FERNANDES COTRIM DE ALMEIDA

**ESTUDO FARMACOCINÉTICO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
DE CLOXACILINA ADMINISTRADAS EM CABRAS TOGGENBURG
NATURALMENTE INFECTADAS POR *CORYNEBACTERIUM*
*PSEUDOTUBERCULOSIS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo Animal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Humberto de Mello Brandão

Coorientador

Prof. Dr. Marcos Ferrante

Lavras - MG

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

de Almeida, João Vitor Fernandes Cotrim.

Estudo farmacocinético de nanopartículas poliméricas de cloxacilina administradas em cabras Toggenburg naturalmente infectadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis* / João Vitor Fernandes Cotrim de Almeida. - 2019.

44 p.: il.

Orientador(a): Humberto de Mello Brandão.

Coorientador(a): Marcos Ferrante.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Linfadenite caseosa. 2. Antibioticoterapia. 3. Nanotecnologia. I. Brandão, Humberto de Mello. II. Ferrante, Marcos. III. Título.

JOÃO VITOR FERNANDES COTRIM DE ALMEIDA

**ESTUDO FARMACOCINÉTICO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
DE CLOXACILINA ADMINISTRADAS EM CABRAS TOGGENBURG
NATURALMENTE INFECTADAS POR *CORYNEBACTERIUM*
*PSEUDOTUBERCULOSIS***

**PHARMACOKINETIC STUDY OF CLOXACILLIN POLYMERIC
NANOPARTICLES ADMINISTERED IN TOGGENBURG GOATS
NATURALLY INFECTED WITH *CORYNEBACTERIUM*
*PSEUDOTUBERCULOSIS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Fisiologia e Metabolismo Animal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 06 de dezembro de 2019

Dr. Alessandro de Sá Guimarães (Embrapa Gado de Leite)

Dr^(a) Patrícia Yoshida Faccioli-Martins (Embrapa Caprinos e Ovinos)

Orientador

Dr. Humberto de Mello Brandão

Coorientador

Prof. Dr. Marcos Ferrante

Lavras - MG

2019

Ao Raimundo, que teve um caso de amor com a vida.

Que Deus o tenha em bom lugar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, os que a vida me deu e aqueles que escolhi pra vida, e aos meus irmãos mais novos. Pedro, Denise, Henrique, Flávia, Lucas e Helena, amo vocês.

Aos amigos, os que viram, ouviram e/ou viveram o mestrado comigo: Sacha, Phê, Dani, Li, Gabi (Ribeirão Preto), Silvão, Pardal, Brunão, Allana, Lulu, Bochechas, Morena, Carine, Deborinha, Negão, sô Marcos, William, Pugão, Vanessa, Bebeto, Caio, Novinha, Cristian, Arthur, Gabi (Lavras), Santeiro, Lillian, Rhadanna, Rodrigo, Geovana, Isa, Ju e Michelle. A esta, um agradecimento especial pela amizade que surgiu de repente, na hora certa, e foi, sem dúvida, uma das melhores surpresas do ano.

Aos meu orientador, Humberto, por sempre me estimular a pensar, ter sendo crítico e confiar nas minhas capacidades. Ao meu coorientador, Marcos, por toda a ajuda, pelos ensinamentos e disponibilidade infundável.

Aos funcionários da Embrapa, desde pesquisadores a retireiros, que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional e pessoal. Em especial, agradeço ao Amarildo, que mostrou a beleza de um “bom dia” sincero, ensinou que a alegria está na simplicidade e finitude das coisas, e provou que educação independe de origem social ou econômica.

Aos membros da banca para avaliação deste projeto e da minha defesa de mestrado, Alessandro e Patrícia, por todo o suporte, pela paciência e pelas inúmeras contribuições à execução deste trabalho.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, representada pela professora Elaine e pela dona Fátima.

Às agências de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES, bem como à Rede Agronano pelo suporte financeiro.

À Embrapa Gado de Leite, sede e campo experimental, por me proporcionar o maior crescimento profissional que tive na vida.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Panorama da caprinocultura no Brasil e no mundo	2
2.2. Linfadenite caseosa em caprinos	5
2.2.1. Aspectos relevantes	5
2.2.2. Eficácia de abordagens terapêuticas com antibióticos	8
2.2.3. Penetração de fármacos em abscessos.....	9
2.4. Avanços da nanotecnologia na Medicina Veterinária.....	13
3. HIPÓTESE.....	17
4. OBJETIVOS	17
5. REFERÊNCIAS	17
SEGUNDA PARTE	26
1. ARTIGO	26
Estudo da farmacocinética plasmática de cloxacilina nanoestruturada e penetração do fármaco em abscessos causados por <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	26
2. AUTORIZAÇÃO PARA USO DOS ANIMAIS NO EXPERIMENTO	44

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura tem se destacado, na última década, como segmento econômico marcante do agronegócio brasileiro, em particular na região Nordeste, cujo efetivo - superior a 7 milhões de animais - representa mais de 92 % do rebanho nacional (DE SÁ et al.; FARIAS et al., 2018). Trata-se de uma atividade direcionada à produção de leite e derivados, carne, e couro, distribuída pelas cinco regiões do país; não obstante, a criação de caprinos resiste a uma forte escassez de políticas agrícolas, as quais são indispensáveis ao desenvolvimento da economia de subsistência rural (HALDAR et al., 2014).

Segundo dados do Censo Agropecuário de 2017, tamanho do rebanho e número de estabelecimentos agropecuários voltados à caprinocultura aumentaram, desde 2006, mais de 16 % (MAGALHÃES et al., 2018). No que diz respeito ao Nordeste, aproximadamente 15 milhões de litros de leite são oriundos de áreas rurais envolvidas na cadeia produtiva da pecuária caprina, desempenhando importante função socioeconômica às famílias nordestinas, tanto na alimentação quanto na geração de renda (MOREIRA e GUIMARÃES FILHO, 2011). Entretanto, devido ao caráter predominantemente extensivista e familiar da caprinocultura nordestina, associado à célere expansão da atividade nos últimos dez anos, graves problemas sanitários têm acometido a cadeia produtiva (FARIAS et al., 2018); dentre estes, consta grande variedade de enfermidades infectocontagiosas, as quais produzem déficit econômico considerável, principalmente em razão dos índices elevados de morbidade e mortalidade, tal como a linfadenite caseosa (GUIMARÃES et al., 2011; SEYFFERT et al., 2010).

De acordo com Tripathi e colaboradores (2016), inflamação crônica e supurativa de linfonodos externos e internos, causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, é descrita, para caprinos e ovinos, como linfadenite caseosa ou doença do abscesso. Trata-se de uma enfermidade cosmopolita, com maior incidência em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, como o Brasil, onde essa ocorre sobretudo nos estados do Nordeste, destacando-se Bahia e Pernambuco (DE SÁ et al., 2018).

O agente etiológico da linfadenite caseosa é o *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis*, bactéria Gram-positiva, intracelular facultativa e mesofílica (GUERRERO et al.,

2018). Segundo Jesse e colaboradores (2016), a principal via de transmissão do patógeno é a contaminação de feridas superficiais, ocasionadas por determinados procedimentos de manejo, como recorte de orelha(s) e/ou cauda, castração, marcação auricular e tosa, pela formação de fômites ou por brigas entre indivíduos de rebanhos distintos, especialmente durante o estabelecimento hierárquico do rebanho/lote. Além da depreciação do valor da pele, condenação de carcaça, diminuição da produção de carne, leite e lã, e redução da eficiência reprodutiva de animais acometidos (SANTIAGO et al., 2013), riscos à saúde pública são relatados devido ao potencial zoonótico do microrganismo (UMER et al., 2017).

Ante a importância econômica e social tanto da caprino quanto da ovinocultura, existe grande demanda entre os produtores rurais no que tange ao controle da linfadenite caseosa. De modo geral, tratamentos com antibiótico apresentam eficácia limitada, devido à baixa penetrabilidade do fármaco em abscesso, além de custo e duração elevados (GUIMARÃES et al., 2011; JESSE et al., 2016; UMER et al., 2017). Por outro lado, estratégias de prevenção e controle da enfermidade, baseados em vacinação, são empregadas em países nos quais a prevalência é significativa, sem, contudo, demonstrarem resultados promissores (DE SÁ et al., 2018; JESSE et al., 2016).

Frente aos resultados não muito alvissareiros de prevenção e controle da linfadenite caseosa, novas abordagens terapêuticas que utilizem, por exemplo, nanopartículas metálicas, têm sido propostas (MOHAMED et al., 2017; STANISIC et al., 2018). Estas apresentam, contudo, efeito cumulativo, o que limita sobremaneira as condições de aplicação comercial destes nanomateriais.

Por outro lado, o emprego de nanocarreadores biodegradáveis que efetuem o direcionamento de fármacos para o interior de abscessos, em animais com linfadenite caseosa, representa uma alternativa promissora à evolução da taxa de sucesso terapêutico. Diante desse contexto, o presente trabalho objetiva avaliar os parâmetros farmacocinéticos de uma formulação de nanopartículas poliméricas de cloxacilina, além da capacidade de *delivery*, em cabras naturalmente infectadas por *C. pseudotuberculosis*, da droga para o interior de abscessos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Panorama da caprinocultura no Brasil e no mundo

Historicamente, a caprinocultura se destaca como parte essencial do agronegócio de muitas regiões do Brasil. Trata-se, atualmente, de importante atividade cultural, social e econômica do Nordeste, desempenhando papel crucial no desenvolvimento regional (SANTIAGO et al., 2013). A produção de alimentos de elevado valor biológico (leite, carne e miúdos) e pele de excelente qualidade, além da adaptabilidade dos animais a regiões semiáridas, fazem da criação de caprinos, em diferentes sistemas, um fator contribuinte indispensável à economia de subsistência da zona rural e da periferia urbana nordestina (DE SÁ et al., 2018).

O mais recente Censo Agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) revelou que, entre 2006 e 2017, a caprinocultura brasileira atingiu 8.25 milhões de cabeças, e que o número de estabelecimentos agropecuários destinados à exploração caprina expandiu de 286.6 para 333.9 mil propriedades em todo o país (FARIAS et al., 2018).

No tocante à caprinocultura leiteira, por exemplo, o Brasil se destaca como maior produtor de leite de cabra da América do Sul, com produção anual superior a 135 mil toneladas, destacando-se os estados do Rio Grande do Norte e Paraíba, os quais produzem 18 e 10 mil litros diários, respectivamente (DA SILVA et al., 2012). No entanto, a cadeia produtiva de caprinos, especialmente no semiárido nordestino, ainda se mostra incipiente, apresentando pontos críticos de ineficiência nos segmentos de criação, transformação e distribuição (MOREIRA e GUIMARÃES FILHO, 2011). A produção nacional de leite caprino, segundo Facó e colaboradores (2011), está distribuída notadamente em duas regiões geográficas: na primeira estão compreendidos os estados nordestinos da Paraíba e do Rio Grande do Norte, os quais são altamente dependentes de programa governamental baseado na compra do leite de pequenos produtores; a segunda, com produção orientada sobretudo pelo mercado, abrange os estados do Sudeste, com destaque para Minas Gerais e Rio de Janeiro, e o sul do Rio Grande do Sul.

Por outro lado, avanços na organização da cadeia produtiva, visando atender o crescimento da demanda por produtos cárneos, incentivar a profissionalização da atividade e, por conseguinte, coibir práticas clandestinas, têm ocorrido na última década. Além disso, frigoríficos passaram a adotar sistemas de monitoramento do desempenho de produtores, com o propósito de adquirirem produtos de maior qualidade (DE SÁ et al., 2018).

Ao redor do mundo os caprinos são encontrados nos mais diversos tipos de ecossistemas, com maior concentração nos trópicos e zonas secas de países em desenvolvimento. Do número total de animais, 70 % pertencem à Ásia, 27.5 % à África, 3.5 % à Europa e 3 % à América - mais de 97 % estão localizados em regiões subdesenvolvidas (ESCAREÑO et al., 2012). Entre 2000 e 2013, o número de animais aumentou na ordem de 34 %, enquanto a produção de leite caprino, entre 2000 e 2012, alcançou aproximadamente 40 % de expansão (SKAPETAS e BAMPIDIS, 2016). De acordo com Devendra (2010), a taxa de crescimento da população de caprinos foi superior ao índice mais vertiginoso de aumento populacional do ser humano, de 2.4 % ao ano, no grupo dos 50 países menos desenvolvidos. Estimou-se que estes albergariam mais de 30 raças nativas melhoradas, as quais seriam potencialmente relevantes à economia, mas que estariam em condições de subutilização.

Segundo Aziz (2010), cabras leiteiras produzem cerca de 15.2 milhões de toneladas de leite anualmente, o que representa 2 % da quantidade total de leite produzido no mundo; destes, países subdesenvolvidos são responsáveis por aproximadamente 83 %.

A nível de comparação, as diretrizes voltadas à cadeia produtiva de leite e derivados, nos sistemas europeu e brasileiro, não possuem correspondência entre si, haja vista que o primeiro é destinado, em grande parte, à fabricação de queijo, ao passo que o segundo está predominantemente baseado na obtenção do leite *per se* (FACÓ et al., 2011). Contudo, por via de regra, a produção de carne caprina é a principal função dos sistemas produtivos de países em desenvolvimento, enquanto em regiões desenvolvidas a produção de carne é secundária à de leite (DEVENDRA, 2010). Ao que tudo indica, independentemente do local de criação, há consenso de que a preservação do estado de saúde dos animais é um fator essencial ao desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva caprina, não só pelo impacto econômico, como pelas implicações na saúde humana, especialmente no que diz respeito a enfermidades com potencial zoonótico (DE SÁ et al., 2018; GUEDES et al., 2012).

Sendo assim, ante o contexto apresentado, estudos acerca de infecções causadas por *C. pseudotuberculosis* podem impactar positivamente os diferentes sistemas de produção de caprinos (GUERRERO et al., 2018; MAHMOOD et al., 2015; MINOZZI et al., 2016).

2.2. Linfadenite caseosa em caprinos

2.2.1. Aspectos relevantes

A presença de abscessos representa um problema bastante usual em propriedades destinadas à caprinocultura, com relatos em todos os continentes. Inquéritos epidemiológicos realizados em Portugal e na Itália revelaram que 90 % dos rebanhos caprinos investigados, em ambos os países, manifestaram pelo menos um caso de abscesso - enquanto o Brasil apresentou índice alarmante de 98 % (MINOZZI et al., 2016). A linfadenite caseosa, ou “mal do caroço”, como é popularmente conhecida no Brasil, trata-se de uma enfermidade crônica e debilitante de pequenos ruminantes; causada por *C. pseudotuberculosis*, é caracterizada pela formação de granulomas (abscessos) em um ou mais linfonodos, notadamente de regiões da cabeça (linfonodo parotídeo), mandíbula (submandibular), do pescoço (retrofaríngeo), escápula (pré-escapular), flanco e das glândulas mamárias. Não obstante, linfonodos mesentéricos e mediastinais também podem ser afetados (DE SÁ et al., 2018; MINOZZI et al., 2016; SANTIAGO et al., 2013). Tal condição é descrita, por conseguinte, como um dos fatores limitantes da criação de caprinos (SILVEIRA et al., 2015).

Considerada, em todo o mundo, como uma das doenças crônicas de potencial zoonótico com maior relevância econômica à caprinocultura e ovinocultura (JESSE et al., 2016), a linfadenite caseosa ocasionalmente acomete bovinos e equinos, e raramente o ser humano (FARIAS et al., 2018).

Os maiores prejuízos associados à doença, em cabras e ovelhas, devem-se ao elevado índice de morbidade nos rebanhos, comprometendo determinadas funções orgânicas e, conseqüentemente, diminuindo o ganho de peso e a produção de leite, causando depreciação da pele, condenação de carcaça e, em casos graves, levando animais à morte (FARIAS et al., 2018; SILVEIRA et al., 2015). A comercialização global de animais infectados, juntamente com programas ineficientes de sanidade, constitui a causa elementar do caráter cosmopolita da linfadenite caseosa (SELLERA et al., 2016). Na África do Sul, Tanzânia, Nigéria, em Mali e no Quênia, a enfermidade é uma das causas da condenação de órgãos e carcaças de caprinos e ovinos. Entre 1996 e 2004, de 201 países que relataram o respectivo panorama sanitário à Organização Mundial de Saúde Animal (da sigla, em francês, OIE), 64

declararam a presença de animais com linfadenite caseosa em regiões fronteiriças (ABEBE e TESSEMA, 2015).

Segundo Umer e colaboradores (2017), indivíduos infectados por *C. pseudotuberculosis*, com quadro de inflamação granulomatosa necrosante em um ou mais linfonodos, têm manifestação de abscessos com ou sem queda dos pelos circundantes, a qual varia de acordo com o grau de maturação desses. Ao término do amadurecimento o abscesso se rompe, acarretando descarga, no ambiente e sobre o corpo do animal, de material purulento (pus) contaminante.

A linfadenite caseosa acomete principalmente caprinos adultos, é altamente contagiosa e pode ser transmitida pelo contato direto entre animal infectado e saudável, e indiretamente pela ingestão de alimento contaminado com pus, ou pelo contato de lesões cutâneas com água, solo, capim, fômites ou estruturas do ambiente contaminados (MINOZZI et al., 2016; SANTIAGO et al., 2013). Portanto, a ocorrência de feridas de pele representa a mais importante porta de entrada de *C. pseudotuberculosis*, o qual se encontra viável, em exsudato purulento, na ordem de 1×10^6 a 5×10^7 unidades formadoras de colônias por grama de material. Sendo assim, a principal conduta voltada ao controle da enfermidade é o isolamento imediato de animais infectados, seguida da drenagem cirúrgica de abscessos (antes da ruptura natural), tendo em vista que estes podem persistir por cerca de dois a três anos em um mesmo indivíduo, devido ao elevado índice de reinfecção (DE SÁ et al., 2018; JESSE et al., 2016; SANTIAGO et al., 2013).

Após infecção, são liberados no local de penetração do microrganismo a exotoxina fosfolipase D e um lipídio de superfície derivado do ácido micólico, dentre outros fatores de virulência, provocando necrose da derme, inflamação e aumento da permeabilidade vascular. Isso favorece a invasividade do patógeno, cujo transporte para linfonodos regionais ocorre por meio de fagócitos; dão-se, assim, as lesões caseosas de linfadenite, denominadas piogranulomas (OREIBY, 2015; WINDSOR e BUSH, 2016).

De acordo com Odhah e colaboradores (2017), o tempo de incubação da bactéria varia, na maioria dos casos, de três a 20 semanas, mas já foram relatados períodos mais curtos, nos quais os indivíduos podem demonstrar febre, alterações nas frequências cardíaca e respiratória, e diminuição do apetite e consumo de alimentos.

A linfadenite caseosa, segundo Mahmood e colaboradores (2015), comumente se apresenta como uma doença subclínica, cujos sinais clínicos são verificados somente após detecção, à inspeção clínica, das lesões em linfonodos superficiais. Conforme descrito por Umer e colaboradores (2017), em determinadas situações, abscessos se desenvolvem em órgãos internos, como pulmões, fígado, rins e baço, caracterizando a forma visceral da enfermidade.

Segundo Oreiby (2015), sinais clínicos ou exames *post mortem* não devem ser utilizados isoladamente como método de referência para diagnóstico da linfadenite caseosa, haja vista que outro(s) agente(s) piogênico(s) pode(m) produzir abscessos similares. Desse modo, além do exame clínico de lesões caseosas superficiais, o diagnóstico definitivo da enfermidade está fundamentado no isolamento e identificação de *C. pseudotuberculosis*, notadamente por meio de técnicas moleculares e bioquímicas, tais como a reação em cadeia da polimerase (da sigla, em inglês, PCR), e o sistema de fitas API (*Analytical Profile Index*) para bactérias corineformes, respectivamente (GUIMARÃES et al., 2011; HUERTA et al., 2013). Além disso, inquéritos soropidemiológicos podem ser realizados por meio de métodos alternativos, mais práticos e rápidos, como o ensaio de imunoabsorção enzimática (da sigla, em inglês, ELISA), o qual apresenta níveis satisfatórios de sensibilidade e especificidade (FARIAS et al., 2018).

A técnica de PCR destinada à investigação dos genes bacterianos 16S RNAr, *rpoB* e da fosfolipase D, por exemplo, resultou em testes de alta sensibilidade, reprodutibilidade e eficiência diagnóstica (GUERRERO et al., 2018). Trata-se de um método promissor para amostras de pus, tanto para identificação de colônias quanto verificação direta do microrganismo, enquanto testes sorológicos são mais indicados para amostras de sangue, a julgar pela baixa quantidade de bactérias na circulação sanguínea do hospedeiro (OREIBY, 2015).

Do ponto de vista hematológico, Odhah e colaboradores (2017) destacaram que cabras desafiadas experimentalmente com *C. pseudotuberculosis* não demonstraram alterações expressivas ao hemograma, enquanto os diferentes tratamentos exibiram contrastes significativos ao leucograma. A partir da verificação, em pequenos ruminantes, de alterações histológicas em órgãos reprodutivos, modificações nos parâmetros seminais, concentração hormonal e níveis de citocina, Umer e

colaboradores (2017) salientaram que a infecção pode estar associada a casos de infertilidade e aborto.

2.2.2. Eficácia de abordagens terapêuticas com antibióticos

Isolados clínicos de *C. pseudotuberculosis* oriundos da Arábia Saudita apresentaram, *in vitro*, elevada sensibilidade à eritromicina, oxitetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, neomicina e amoxicilina, enquanto novobiocina, cloxacilina, canamicina, estreptomina e nitrofurantoína demonstraram efeito moderado. Gentamicina, sulfametoxazol com trimetoprima, e flumequina, por sua vez, exibiram baixa atividade antibacteriana (AL-TRAIF et al., 2017). Corroborando com os resultados supramencionados, Robaj e colaboradores (2017) verificaram que, *in vitro*, isolados clínicos búlgaros foram totalmente susceptíveis à oxitetraciclina, ao ácido clavulânico e amoxicilina, e altamente sensíveis à cloxacilina (95.8 %), gentamicina (91.7 %) e ao trimetoprim (83.3 %). Por outro lado, verificou-se elevada resistência à estreptomina (83.3 %) e penicilina G (62.5 %). No Brasil, de acordo com Mattos et al. (2018), isolados clínicos da Bahia apresentaram resistência à oxacilina, mas sensibilidade à penicilina, neomicina, enrofloxacina, ciprofloxacina, cefalotina, amoxicilina e ampicilina.

Embora *C. pseudotuberculosis* seja sensível à maioria dos antibióticos testados *in vitro*, os resultados terapêuticos *in vivo* são bastante variáveis, o que torna, em muitos casos, determinadas abordagens terapêuticas questionáveis frente aos inúmeros casos de recidiva. Apesar de Gururaj e colaboradores (2018), assim como Senturk e Temizel (2006), terem demonstrado cura clínica de pequenos ruminantes naturalmente infectados pela bactéria, a partir de tratamento com ciprofloxacina associada à rifamicina/oxitetraciclina, Baird e Fontaine (2007) apontam lacunas em estudos acerca de terapias contra linfadenite caseosa, destacando que apenas a avaliação clínica como fator determinante da cura é insuficiente, sendo, portanto, imprescindível a comprovação de cura bacteriológica.

De forma geral, a refratariedade *in vivo* de *C. pseudotuberculosis* aos antibióticos pode ser atribuída à baixa eficácia do grupo farmacológico, tendo em vista que estes apresentam limitações para atingirem os respectivos limiares terapêuticos em subcompartimentos biológicos, nos quais patógenos podem estar localizados. Isso explica porque antimicrobianos, quando utilizados no tratamento da linfadenite

caseosa, têm acesso limitado ao interior de fagócitos. Esses precisam atravessar as membranas celulares do hospedeiro, superar a capacidade de produção de biofilme pelas bactérias, e transpor a parede fibrosa dos abscessos (STANISIC et al., 2018; BAIRD e MALONE, 2010; GUIMARÃES et al., 2011; IVANOVIĆ et al., 2009). Assim, protocolos terapêuticos comumente implementados consistem na drenagem cirúrgica do abscesso, seguida da utilização de antibióticos sistêmicos por longos períodos, o que onera o procedimento, além de suscitar questionamentos relativos à eficácia deste (SELLERA et al., 2016).

Diante disso, em contraposição à antibioticoterapia, popularizou-se entre os criadores de pequenos ruminantes a drenagem cirúrgica de abscessos, e posterior cauterização química do sítio de infecção com solução de iodo a 10 % (SANTIAGO et al., 2013; SANTOS et al., 2019; SELLERA et al., 2016; SILVEIRA et al., 2015).

2.2.3. Penetração de fármacos em abscessos

A capacidade de adentrar os abscessos, e atingir o interior de células fagocitárias, configura o maior obstáculo à utilização de antibióticos no tratamento da linfadenite caseosa (STANISIC et al., 2018; BAIRD e MALONE, 2010; IVANOVIĆ et al., 2009).

Segundo Wagner e colaboradores (2006), abscessos consistem, anatomicamente, de parede fibrótica externa, camada interna de leucócitos, e área central de detritos necróticos. Tanto a composição quanto a permeabilidade da parede variam de acordo com o tempo de infecção e o estágio de encapsulamento. De acordo com Guimarães e colaboradores (2011), lesões de linfadenite caseosa têm sua gênese a partir da liberação, por macrófagos, de enzimas lisossômicas. Na fase inicial de formação dos abscessos, uma membrana piogênica separa as lesões purulentas do tecido circundante. Na borda destes se desenvolve tecido de granulação, o qual é substituído por cápsula fibrosa - apesar da curetagem química, com solução de iodo a 10 %, promover a queda desta estrutura, bactérias viáveis podem ser encontradas no tecido adjacente - à medida em que ocorre cronificação da inflamação (WAGNER et al., 2006). Macroscopicamente, a superfície de corte do abscesso apresenta uma cápsula fibrosa preenchida por conteúdo caseoso laminado, amarelo-esverdeado e sem odor (DAR et al., 2013).

Os achados microscópicos, em linfonodos de animais infectados por *C. pseudotuberculosis*, são caracterizados por áreas multifocais de material caseoso na região mais interna, zona densa de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e histiócitos externamente a estas, e tecido conjuntivo em fase proliferativa na camada mais externa do abscesso (HASSAN et al., 2012). Verifica-se, em casos de processo inflamatório agudo, aumento na concentração de mucopolissacarídeos, ácidos e neutros, dentro e ao redor dos abscessos (DAR et al., 2013).

No que tange à penetração de antibióticos em abscesso, segundo Sauermann e colaboradores (2005), condições físico-químicas adversas, como alta ligação a proteínas, ambiente anaeróbio e baixo pH, são responsáveis pela baixa concentração de antimicrobianos parenterais em lesões granulomatosas. Além disso, Clothier e colaboradores (2011) apontaram que a atividade fagocitária de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, no interior do abscesso, está constantemente prejudicada. Sendo assim, para que um fármaco exerça ação antimicrobiana em pus, Wagner e colaboradores (2006) salientaram que, a partir do plasma, o antibiótico deve atravessar o endotélio capilar, que separa o plasma do líquido intersticial, e se difundir através do fluido espacial intersticial. Por fim, o medicamento poderá, eventualmente, atravessar a membrana do abscesso, a qual separa o material purulento do interstício.

Dentro desse contexto, para que as barreiras à penetração de antibióticos, nas lesões granulomatosas de linfadenite caseosa, sejam efetivamente transpostas, são necessárias altas concentrações plasmáticas destes - o gradiente de concentração, no plasma ou no abscesso, é o único fator que pode elevar o transporte absoluto de um fármaco (SAUERMANN et al., 2005). Considerando que *C. pseudotuberculosis* produz sítios de infecção densamente encapsulados, os quais são essencialmente isolados do organismo (WASHBURN et al., 2013), há inúmeros estudos destinados à avaliação clínica do uso de antibióticos para o tratamento da linfadenite caseosa; em contrapartida, são poucos os que investigam a efetiva penetração desses em abscesso, ou até mesmo que propõem alternativas para aumento da penetrabilidade em estruturas encapsuladas.

A eficácia de determinada terapia antibiótica, contra microrganismos intracelulares, é determinada pela susceptibilidade bacteriana, capacidade do antibiótico entrar e se acumular em células do hospedeiro, e de se difundir por subcompartimentos celulares nos quais o patógeno está localizado

(KAMRUZZAMAN et al., 2017). Todavia, a despeito da importância, apenas um estudo sobre penetração de antibiótico, em abscesso causado por *C. pseudotuberculosis*, foi encontrado. O experimento, conduzido por Washburn e colaboradores (2013), caracterizou-se pelo uso de câmaras artificiais como modelo dos abscessos de linfadenite caseosa, e pela administração de tulatromicina, em dose única e pela via subcutânea, em 12 cabras, para cálculo da dinâmica de penetração do fármaco em abscesso. A quantidade do antibiótico, no fluido intersticial, permaneceu acima da concentração inibitória mínima (CIM) durante 15 dias. Além disso, seis de 12 câmaras infectadas pelo agente não apresentaram crescimento de colônias bacterianas após 15 dias da aplicação do medicamento, o que demonstrou, *in vivo*, o potencial terapêutico da tulatromicina para o fim desejado.

2.3. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiologia, virulência e patogenia da infecção

O gênero *Corynebacterium* pertence à classe Actinobacteria, e compreende um conjunto de 88 espécies classificadas taxonomicamente, do qual algumas destas são consideradas agentes zoonóticos, como *Corynebacterium ulcerans*, *C. xerosis* e *C. pseudotuberculosis* (BURKOVSKI, 2013). O último se trata de uma bactéria Gram-positiva e intracelular facultativa, classificada em dois biotipos, com base no hospedeiro de eleição e na atividade redutora de nitrato (DORNELES et al., 2014). De acordo com Silveira e colaboradores (2015), *C. pseudotuberculosis* é um patógeno não esporulado, aeróbico e agente intracelular facultativo de macrófagos; permanece no interior destes protegido de ação fagocítica, por meio de um lipídio de ação leucotóxica presente na superfície da parede celular. Segundo Rhodes e colaboradores (2015), os dois biovars geneticamente distintos são: biovar *equi*, que afeta cavalos e é nitrato redutase positivo; biovar *ovis*, que acomete ovinos e caprinos, e é nitrato redutase negativo.

O microrganismo é pleomórfico, exibindo formas cocóides e de bastões curtos, com variação de tamanho de 0.5 a 0.6 μm por 1.0 a 3.0 μm . Além disso, não possui cápsula e, apesar de dispor de fimbrias, não apresenta motilidade (BURKOVSKI, 2013). *In vitro*, *C. pseudotuberculosis* cresce melhor a 37 °C (mesofílico), e em pH de 7.0 a 7.2 (GUERRERO et al., 2018).

No que tange à virulência, os principais mecanismos são os lipídios da parede celular, e a enzima fosfolipase D. Esta atua como exotoxina glicoproteica, ou citotoxina, capaz de hidrolisar moléculas de esfingomielina presentes na membrana celular de leucócitos, favorecendo a penetração da bactéria nestes (DE SÁ et al., 2018). Os lipídios, por sua vez, ligam-se à camada de peptidoglicanos da parede celular bacteriana, promovendo estabilidade e, por conseguinte, contribuindo para a sobrevivência do microrganismo dentro das células fagocitárias (RAYNAL et al., 2018). A fosfolipase D, de acordo com Silveira e colaboradores (2015), causa necrose da derme, é hemolítica, e atua sobre o endotélio de modo a aumentar a permeabilidade de vasos sanguíneos e linfáticos, facilitando, destarte, a invasão bacteriana no organismo do hospedeiro. Dessa forma, a patogenia da infecção é favorecida, e o patógeno consegue migrar do local de inoculação para os linfonodos periféricos mais próximos deste (DE SÁ et al., 2018). Ademais, segundo Odhah e colaboradores (2017), há relação inversa entre a fosfolipase D e as concentrações de proteínas de fase aguda.

Quanto aos lipídios, os ácidos micólicos (C22 a C36) têm papel fundamental na patogenia de infecções por *C. pseudotuberculosis*, pois: conferem resistência a agravos químicos na parede celular e à desidratação do agente; atribuem, para determinados fármacos, baixa permeabilidade à parede celular; possibilitam a formação de biofilme (PAWEŁCZYK e KREMER, 2014). O revestimento de ácido micólico, como o principal fator de virulência expresso na parede celular, contribui com a capacidade de sobrevivência da bactéria, em condições extremas e por longos períodos, como um parasita intracelular facultativo (ODHAH et al., 2017). Por via de regra, os lipídios presentes na superfície da parede celular protegem o microrganismo contra enzimas proteolíticas de fagolisossomos, permitindo que este consiga se disseminar através dos tecidos, e desenvolver lesões granulomatosas em linfonodos (DE SÁ et al., 2018).

Além dos dois fatores de virulência supracitados, outros genes parecem estar intimamente relacionados à patogenicidade de *C. pseudotuberculosis*, como o *fagA*, *fagB*, *fagC*, *fagD* e *hsp60*, os quais codificam proteína integral de membrana, transportador de ferro de enterobactina, proteína de ligação a ATP citoplasmático e proteína siderófora de ligação ao ferro, respectivamente (DE SÁ et al.; GUERRERO et al., 2018). Constatou-se que alguns genes, associados à absorção de ferro, carbono

e magnésio, podem favorecer o processo de adaptação de cepas bacterianas a diferentes hospedeiros. Esses codificam, destarte, mecanismos de adesão, invasão, colonização e proliferação do microrganismo, assim como recursos de evasão do sistema imunológico (RUIZ et al., 2011). Dessa forma, a elevada frequência dos genes supramencionados, em isolados bacterianos oriundos de lesões cutâneas, revela a patogenicidade destes, os quais podem ser candidatos a modelos vacinais (DE SÁ et al., 2013).

Uma das primeiras técnicas destinadas à tipagem de *C. pseudotuberculosis* foi a biotipagem, que dividiu os isolados em biovar *ovis* e *equi*, mais comumente relacionados a cepas isoladas de ovelhas e cavalos, respectivamente (GUIMARÃES et al., 2011). Além disso, características fenotípicas podem ser vinculadas a genótipos, como foi descrito à capacidade redutora de nitrato, a qual possui relação com diferentes padrões de restrição e ribotipos. Por outro lado, o patógeno tem sido considerado excepcionalmente homogêneo, com baixa diversidade genética demonstrada por ensaios moleculares de genotipagem (DORNELES et al., 2014).

No que tange à patogenia da doença, conforme abordado previamente, o início da infecção ocorre por meio da penetração do agente no hospedeiro, pelas mucosas oral ou nasal, e principalmente através de lesões cutâneas; a disseminação, por sua vez, dá-se com o patógeno livre ou no interior de células fagocitárias, como macrófagos, em vasos sanguíneos e linfáticos aferentes de linfonodos e/ou vísceras (DE SÁ et al., 2018). Essas realizam fagocitose do microrganismo, formando, assim, o fagolisossomo, dentro do qual algumas bactérias podem sobreviver devido à provável relação entre a camada lipídica da parede celular destas e a inibição da produção de óxido nítrico em células da resposta imune inata (BASTOS et al., 2012; STEFANSKA et al., 2010). Os macrófagos, segundo Raynal e colaboradores (2018), destacam-se na patogenia da infecção por *C. pseudotuberculosis*, haja vista que proporcionam meio intracelular favorável à sobrevivência e multiplicação desse, além de contribuírem para a evasão do sistema imunológico.

2.4. Avanços da nanotecnologia na Medicina Veterinária

Nanotecnologia é o estudo de materiais em nanoescala, dos quais pelo menos uma dimensão varia entre 1 e 100 nm (10^{-9} a 10^{-7} m), e que são comumente denominados partículas ou nanopartículas (HILL e LI, 2017). Tal ciência tem revolucionado a

Medicina, particularmente nas áreas de imagem e *delivery* de medicamentos. De acordo com Underwood e van Eps (2012), as nanopartículas têm sido desenvolvidas, ao longo dos últimos 30 anos, em pesquisas de novos métodos de diagnóstico e de terapias orientadas a células, tecidos e órgãos específicos. A nanotecnologia, segundo Manuja e colaboradores (2012), abriu novas perspectivas de aplicação nas áreas da biologia molecular, biotecnologia, e nas mais diversas vertentes da Medicina Veterinária e ciências animais.

Conforme enfatizado por Rodrigues e colaboradores (2017), quando princípios básicos de sustentabilidade estão alinhados, os nanomateriais podem auxiliar na redução de insumos utilizados na produção animal, promovendo, destarte, uma gestão eficiente da saúde animal.

Ante o exposto, formulações de nanopartículas objetivam superar inúmeras limitações de fármacos convencionais, incluindo toxicidade, baixa solubilidade em água, instabilidade e aquelas relativas a propriedades farmacocinéticas, além de contribuir para o avanço da medicina personalizada (LIN et al., 2015). Desse modo, saúde e bem-estar, além de melhorias em quantidade e qualidade da produção, podem ser alcançados por meio da tradução da nanotecnologia em serviços e produtos eficazes destinados a práticas veterinárias (MANUJA et al., 2012). Aplicações práticas de lipossomos na liberação de drogas, com nanopartículas de albumina e nanoconjugados poliméricos, por exemplo, emergiram de pesquisas realizadas nos anos 1970, e após quatro décadas mais de 25 medicamentos nanoparticulados foram aprovados para uso humano (IRACHE et al., 2011). Para animais de companhia, composições farmacêuticas lipossomais já estão disponíveis comercialmente, como a bupivacaína, cuja apresentação comercial é denominada Nocita®, e o paclitaxel, encontrado no mercado como Paccal-vet®.

De modo geral, uma formulação nanoparticulada, em comparação à droga livre, requer dose reduzida do princípio ativo, viabilizando, por conseguinte, o emprego de fármacos humanos dispendiosos na Medicina Veterinária. Além disso, medicamentos nanoestruturados podem reduzir os níveis de resíduos em carcaça, produtos e subprodutos da produção animal, e mitigar a seleção de bactérias multirresistentes. Assim, tais formulações têm o potencial de contribuir significativamente para a sustentabilidade das mais diversas cadeias produtivas agropecuárias (UNDERWOOD e VAN EPS, 2012). De acordo com Rodrigues e colaboradores (2017), o aumento da

ressonância plasmônica e da fotoatividade de nanomateriais, bem como a razão entre a superfície e o volume destes, podem ser aproveitados para incremento da eficiência de sistemas agrícolas. Além disso, o nanoencapsulamento, segundo Handford e colaboradores (2014), pode melhorar significativamente as propriedades de compostos bioativos, tais como biodistribuição, solubilidade, direcionamento, mucoadesividade e absorção através de células, além de prolongar a permanência destes no trato gastrointestinal.

Conforme descrito por Lin e colaboradores (2015), as nanopartículas podem ser categorizadas como inorgânicas (*e.g.* nanotubos de carbono) e orgânicas (*e.g.* micelas poliméricas). Existe uma grande variedade de aplicações da nanotecnologia na Medicina Veterinária, incluindo partículas metálicas para tratamento de câncer, pontos quânticos para diagnóstico *in vivo* de enfermidades, nanovetores para fármacos e nanopartículas para terapia gênica (KUZMA, 2010). Estas, dentre inúmeras utilidades, promovem novas abordagens para elevarem a biodistribuição/biodisponibilidade de fármacos, vitaminas, minerais e vacinas, além de fomentarem a produção de novos testes para diagnósticos rápidos e mais sensíveis, no que diz respeito a doenças em animais (UNDERWOOD e VAN EPS, 2012). Determinados nanomateriais metálicos têm sido aprovados como agentes bactericidas e bacteriostáticos, destacando-se a prata, o ouro e o zinco, cada um com diferentes propriedades e espectro de atividades específico (MOHAMED et al., 2017). Santos e colaboradores (2019) apontaram que nanopartículas de prata apresentam perfil antibacteriano marcante, contribuem para a cicatrização de feridas, possuem elevada durabilidade e são relativamente acessíveis. Essas, de acordo com Stanisic e colaboradores (2018), podem reduzir a cascata inflamatória e a proliferação tecidual, assegurando maior organização de fibras colágenas e minimizando a formação de cicatrizes.

Mohamed e colaboradores (2017), em avaliação da eficiência e do mecanismo de ação de nanopartículas de ouro contra *C. pseudotuberculosis*, observaram que estas induziram atividade antimicrobiana intracelular, a qual foi atribuída à produção de espécies reativas de oxigênio; estas, por sua vez, aumentam o nível de estresse oxidativo das bactérias. No estudo de Stanisic e colaboradores (2018), formulou-se uma pomada dérmica à base de nanopartículas de prata, para aplicação em feridas cirúrgicas de animais com linfadenite caseosa. Todos os testes bioquímicos realizados

durante o experimento apontaram para significativa evolução clínica desses, a partir do aumento de duas a 3 vezes da cicatrização de pele. Além disso, nenhum dos indivíduos tratados com a pomada apresentou recidiva, e não foram constatados quaisquer efeitos colaterais. Todavia, apesar de promissor, o emprego de nanopartículas metálicas em novas abordagens terapêuticas ainda é submetido a muitos questionamentos da comunidade acadêmica, sobretudo em função do potencial efeito cumulativo dessas (MENDOZA e BROWN, 2019). Portanto, a utilização de materiais biodegradáveis, para síntese de nanopartículas destinadas a uso terapêutico, têm sido preterida à de não biodegradáveis.

O emprego da nanotecnologia na indústria farmacêutica vem impulsionando, a passos largos, o desenvolvimento de novas formulações com moléculas já tradicionalmente utilizadas; passaram a ser produzidos, destarte, medicamentos cada vez mais individualizados, eficazes e com menos efeitos adversos (IRACHE et al., 2011). Por via de regra, diferentes formulações nanoparticuladas podem elevar o índice terapêutico e dose máxima tolerada, exibir parâmetros farmacocinéticos melhores ou até mesmo perfil de toxicidade reduzido. Tal abordagem, para Lin e colaboradores (2015), oferece novas oportunidades a drogas que, embora eficazes, são tóxicas, pouco solúveis em água e/ou constituídas por moléculas instáveis, de modo que essas sejam aplicadas em estudos clínicos veterinários. De acordo com Irache e colaboradores (2011), nanomateriais proporcionam aumento do desempenho biológico e farmacológico de inúmeros fármacos, ensejando alternativas interessantes para formulação de moléculas de uso corriqueiro na terapêutica, bem como para novos compostos oriundos de biotecnologia.

No tocante a protocolos terapêuticos destinados ao controle de infecções por bactérias intracelulares, a eficácia reduzida dos antibióticos existentes fomentou a necessidade de aperfeiçoamento desses. Diante disso, o uso de nanopartículas biodegradáveis vem se tornando uma estratégia promissora ao aumento da concentração intracelular dos fármacos (KAMRUZZAMAN et al., 2017). Ainda que nanopartículas sejam consideravelmente maiores do que moléculas de antibióticos, essas podem favorecer a entrada de medicamentos em células específicas, seja por mecanismos de fagocitose ou pinocitose. Ambas podem ocorrer por reconhecimento inespecífico, mediado pela carga superficial da nanopartícula, por exemplo, e

reconhecimento específico, mediado pelos anticorpos utilizados para “decoreção” da superfície de nanopartículas (MENDOZA e BROWN, 2019).

Além disso, no que diz respeito a tamanho, quando nanocarreadores atingem o interstício tecidual, o trânsito destes para o sistema linfático tende a ser mais lento do que o do fármaco livre, reduzindo, assim, o *clearance* tecidual do medicamento nanoestruturado (UNDERWOOD e VAN EPS, 2012). Dessa forma, antes de ganharem a circulação sanguínea, as nanopartículas podem ser alvo de células do sistema fagocitário mononuclear e de células dendríticas (CD). O tamanho da partícula assume, então, papel relevante na determinação da eficiência de direcionamento e de retenção tecidual do fármaco. Isso ocorre devido à importância de se considerar que partículas com tamanhos entre 10 e 100 nm podem transitar facilmente pelo interstício celular, e, assim, ganhar o sistema linfático e ser direcionadas para as CD residentes do linfonodo (MANOLOVA et al., 2008; WAECKERLE-MEN e GROETTRUP, 2005). Partículas com mais de 100 nm, por sua vez, tendem a ser fagocitadas por células apresentadoras de antígenos (CAAs) periféricas, tendo em vista que CD apresentam tropismo por partículas entre 100 e 200 nm, enquanto macrófagos costumam fagocitar, preferencialmente, partículas de 200 a 600 nm (KANCHAN e PANDA, 2007; MANOLOVA et al., 2008). No caso de partículas com diâmetro inferior a 10 nm, pode ocorrer drenagem para capilares sanguíneos (MANOLOVA et al., 2008), evitando-se ação mais efetiva das CAAs.

3. HIPÓTESE

O sistema de cloxacilina nanoencapsulada, quando administrado em torno de lesões granulomatosas pela via subcutânea, proporciona a retenção do fármaco no interior de abscessos causados por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos.

4. OBJETIVOS

- I. Determinar os parâmetros farmacocinéticos da cloxacilina nanoencapsulada após aplicação na região peri-abscesso, pela via subcutânea, em cabras leiteiras;
- II. Determinar o perfil de retenção da cloxacilina, para cabras leiteiras, em abscessos causados por *Corynebacterium pseudotuberculosis* após aplicação de uma formulação nanoestruturada na região peri-abscesso e pela via subcutânea.

5. REFERÊNCIAS

ABEBE, D.; TESSEMA, T. S. Determination of *Corynebacterium pseudotuberculosis* prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of isolates from lymph nodes of sheep and goats at an organic export abattoir, Modjo, Ethiopia. **Letters in applied microbiology**, v. 61, n. 5, p. 469-476, 2015.

AL-TRAIF, B.; HOUSAWI, F. M. T.; SALEM, M. A.; AL-SAKTAWI, K. A.; FADLELMULA, A. Small Ruminants Abscesses: Bacterial Etiology, Antibiogram and Haematological Study in the East of Saudi Arabia. **Microbiology Research Journal International**, p. 1-11, 2017.

AZIZ, M. A. Present status of the world goat populations and their productivity. **World**, v. 861, n. 1078.2, p. 1, 2010.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **Journal of comparative pathology**, v. 137, n. 4, p. 179-210, 2007.

BAIRD, G. J.; MALONE, F. E. Control of caseous lymphadenitis in six sheep flocks using clinical examination and regular ELISA testing. **Veterinary Record**, v. 166, n. 12, p. 358-362, 2010.

BASTOS, B. L.; PORTELA, R. W. D.; DORELLA, F. A.; RIBEIRO, D.; SEYFFERT, N.; CASTRO, T. L. D. P.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: immunological responses in animal models and zoonotic potential. **J Clin Cell Immunol S**, v. 4, p. 5, 2012.

BURKOVSKI, A. Cell envelope of corynebacteria: structure and influence on pathogenicity. **ISRN microbiology**, v. 2013, 2013.

CLOTHIER, K. A.; LEAVENS, T.; GRIFFITH, R. W.; WETZLICH, S. E.; BAYNES, R. E.; RIVIERE, J. E.; TELL, L. A. Pharmacokinetics of tulathromycin after single and multiple subcutaneous injections in domestic goats (*Capra aegagrus hircus*). **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 34, n. 5, p. 448-454, 2011.

DA SILVA, H. W.; GUIMARÃES, C. R. B.; OLIVEIRA, T. S. Aspectos da exploração da caprinocultura leiteira no Brasil. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 2, n. 2, 2012.

DAR, L. M.; HUSSAIN, S. A.; RASHID, A.; PARIHAR, S.; ABDULLAH, S.; RATHER, F. A. Caseous lymphadenitis in a sheep - postmortem and histopathological findings. **Int. J. Livestock Res.**, v. 3, n. 3, p. 69-73, 2013.

DE SÁ, M. C. A.; ROCHA FILHO, J. T. R.; ROSA, D. S.; OLIVEIRA, S. A. S.; FREIRE, D. P.; ALCANTARA, M. E.; DA COSTA, M. M.; MEYER, R. Linfadenite caseosa em caprinos e ovinos: Revisão. **PUBVET**, v. 12, p. 133, 2018.

DEVENDRA, C. Concluding synthesis and the future for sustainable goat production. **Small Ruminant Research**, v. 89, n. 2-3, p. 125-130, 2010.

DORNELES, E. M. S.; SANTANA, J. A.; RIBEIRO, D.; DORELLA, F. A.; GUIMARÃES, A. S.; MOAWAD, M. S.; SELIM, S. A.; GARALDI, A. L. M.; MIYOSHI, A.; RIBEIRO, M. G.; GOUVEIA, A. M. G.; AZEVEDO, V.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P. Evaluation of ERIC-PCR as genotyping method for *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e98758, 2014.

ESCAREÑO, L.; SALINAS-GONZALEZ, H.; WURZINGER, M.; IÑIGUEZ, L.; SÖLKNER, J.; MEZA-HERRERA, C. Dairy goat production systems. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 1, p. 17-34, 2012.

FACÓ, O.; LÔBO, R. N. B.; GOUVEIA, A. M. G.; GUIMARÃES, M. P. S. L. M. P.; FONSECA, J. F.; DOS SANTOS, T. N. M.; DA SILVA, M. A. A.; VILLELA, L. C. V. Breeding plan for commercial dairy goat production systems in southern Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 98, n. 1-3, p. 164-169, 2011.

FARIAS, A. M.; ALVES, J. R. A.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LIMA, A. M. C.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J. Soroprevalência da infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos no Nordeste brasileiro utilizando técnica de imunoabsorção enzimática (ELISA-indireto). **Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2018.

GUEDES, C. M. C.; PASSOS, F. U.; SAMPAIO, R. R. O Monitoramento de Desempenho está alinhado com a Estratégia? Observação em frigoríficos da caprinovinocultura da Bahia. **REGE-Revista de Gestão**, v. 19, n. 3, p. 415-433, 2012.

GUERRERO, J. A. V.; JIMÉNEZ, R. M. O.; DIBARRAT, J. A.; LEÓN, F. H.; MORALES-ERASTO, V.; SALAZAR, H. G. M. Isolation and molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep and goats in Mexico. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 304-309, 2018.

GUIMARÃES, A. S.; DO CARMO, F. B.; PAULETTI, R. B.; SEYFFERT, N.; RIBEIRO, D.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A. M. G. Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. **IIOAB J**, v. 2, n. 11, 2011.

GURURAJ, K.; SINGH, D.; PAWAIYA, R.; ANDANI, D.; GANGWAR, N.; MISHRA, A.; KUMAR, A. Investigation of an outbreak of caseous lymphadenitis in goats. **Indian Journal of Small Rumin.**, v. 24, n. 1, p. 95-100, 2018.

HALDAR, A.; PAL, P.; DATTA, M.; PAUL, R.; PAL, S. K.; MAJUMDAR, D.; PAN, S. Prolificacy and its relationship with age, body weight, parity, previous litter size and body linear type traits in meat-type goats. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 27, n. 5, p. 628, 2014.

HANDFORD, C. E.; DEAN, M.; HENCHION, M.; SPENCE, M.; ELLIOTT, C. T.; CAMPBELL, K. Implications of nanotechnology for the agri-food industry: opportunities, benefits and risks. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, n. 2, p. 226-241, 2014.

HASSAN, S. S.; SCHNEIDER, M. P. C.; RAMOS, R. T. J.; CARNEIRO, A. R.; RANIERI, A.; GUIMARÃES, L. C.; DE CASTRO, S. S. Whole-genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain Cp162, isolated from camel. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 20, p. 5718-5719, 2012.

HILL, E. K.; LI, J. Current and future prospects for nanotechnology in animal production. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 26, 2017.

HOELZLE, L. E.; SCHERRER, T.; MUNTWYLER, J.; WITTENBRINK, M. M.; PHILIPP, W.; HOELZLE, K. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. **Veterinary microbiology**, v. 164, n. 3-4, p. 359-365, 2013.

HUERTA, B.; GÓMEZ-GASCÓN, L.; VELA, A. I.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F.; CASAMAYOR, A.; TARRADAS, C.; MALDONADO, A.

Comparison of two biochemical methods for identifying *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from sheep and goats. **The Veterinary Journal**, v. 196, n. 3, p. 552-554, 2013.

IRACHE, J. M.; ESPARZA, I.; GAMAZO, C.; AGÜEROS, M.; ESPUELAS, S. Nanomedicine: novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Veterinary parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 47-71, 2011.

IVANOVIĆ, S.; ŽUTIĆ, M.; PAVLOVIĆ, I.; ŽUJOVIĆ, M. Caseous lymphadenitis in goats. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 25, n. 5-6-2, p. 999-1007, 2009.

JESSE, F. F. A.; BITRUS, A. A.; ABBA, Y.; CHUNG, E. L. T.; SADIQ, M. A.; HAMBALI, I. U.; PERERA, H.; HARON, A. W.; LILA, M. A. M.; SAHAREE, A. A.; NORSIDIN, M. J.; HARITH, A. Strategic management of a clinical case of recurrent caseous lymphadenitis in a goat farm. **Res. J. Vet. Pract**, v. 4, n. 3, p. 42-46, 2016.

KAMRUZZAMAN, M.; SHOMA, S.; THOMAS, C. M.; PARTRIDGE, S. R.; IREDELL, J. R. Plasmid interference for curing antibiotic resistance plasmids in vivo. **PLoS One**, v. 12, n. 2, 2017.

KANCHAN, V.; PANDA, A. K. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. **Biomaterials**, v. 28, n. 35, p. 5344-5357, 2007.

KUZMA, J. Nanotechnology in animal production—Upstream assessment of applications. **Livestock Science**, v. 130, n. 1-3, p. 14-24, 2010.

LIN, T.; RODRIGUEZ JR, C. O.; LI, Y. Nanomedicine in veterinary oncology. **The Veterinary Journal**, v. 205, n. 2, p. 189-197, 2015.

MAGALHÃES, K. A.; MARTINS, E. C.; DE LUCENA, C. C.; HOLANDA FILHO, Z. F. Panorama da ovinocultura e da caprinocultura a partir do Censo Agropecuário 2017. **Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2018.

MAHMOOD, Z. K. H.; JESSE, F. F.; SAHAREE, A. A.; JASNI, S.; YUSOFF, R.; WAHID, H. Assessment of blood changes post-challenge with *Corynebacterium*

pseudotuberculosis and its exotoxin (phospholipase D): A comprehensive study in goat. **Veterinary world**, v. 8, n. 9, p. 1105, 2015.

MANOLOVA, V.; FLACE, A.; BAUER, M.; SCHWARZ, K.; SAUDAN, P.; BACHMANN, M. F. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. **European journal of immunology**, v. 38, n. 5, p. 1404-1413, 2008.

MANUJA, A.; KUMAR, B.; SINGH, R. K. Nanotechnology developments: opportunities for animal health and production. **Nanotechnology Development**, v. 2, n. 1, p. e4-e4, 2012.

MATTOS, M. M.; SANTOS, L. M.; PORTELA, R. W.; DE ARAÚJO, R. P. C. Sensibilidade in vitro a antimicrobianos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolados de pequenos ruminantes da região Centro-Norte do Estado da Bahia. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 17, n. 3, p. 330-336, 2018.

MENDOZA, R. P.; BROWN, J. M. Engineered nanomaterials and oxidative stress: Current understanding and future challenges. **Current opinion in toxicology**, v. 13, p. 74-80, 2019.

MINOZZI, G.; MATTIELLO, S.; GROSSO, L.; CREPALDI, P.; CHESSA, S.; PAGNACCO, G. First insights in the genetics of caseous lymphadenitis in goats. **Italian Journal of Animal Science**, v. 16, n. 1, p. 31-38, 2016.

MOHAMED, M. M.; FOUAD, S. A.; ELSHOKY, H. A.; MOHAMMED, G. M.; SALAHELDIN, T. A. Antibacterial effect of gold nanoparticles against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **International journal of veterinary science and medicine**, v. 5, n. 1, p. 23-29, 2017.

MOREIRA, J. N.; GUIMARÃES FILHO, C. Sistema tradicionais para a produção de caprinos e ovinos. **Embrapa Semiárido-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2011.

ODHAH, M. N.; ABDULLAH, F. F. J.; HARON, A. W.; LILA, M. A. M.; ZAMRI-SAAD, M.; KHUDER, Z.; HAMBALI, I. U.; UMAR, M.; SALEH, W. M. Hemogram responses in goats toward challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogen mycolic acids. **Veterinary world**, v. 10, n. 6, p. 655, 2017.

OREIBY, A. F. Diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goat. **Small Ruminant Research**, v. 123, n. 1, p. 160-166, 2015.

PAWELCZYK, J.; KREMER, L. The molecular genetics of mycolic acid biosynthesis. In: **Molecular Genetics of Mycobacteria, Second Edition**. American Society of Microbiology, p. 611-631, 2014.

RAYNAL, J. T.; BASTOS, B. L.; VILAS-BOAS, P. C. B.; SOUSA, T. J.; COSTA-SILVA, M.; SÁ, M. C. A.; MEYER, R. Identification of membrane-associated proteins with pathogenic potential expressed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* grown in animal serum. **BMC research notes**, v. 11, n. 1, p. 73, 2018.

RHODES, D. M.; MAGDESIAN, K. G.; BYRNE, B. A.; KASS, P. H.; EDMAN, J.; SPIER, S. J. Minimum Inhibitory Concentrations of equine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates (1996–2012). **Journal of veterinary internal medicine**, v. 29, n. 1, p. 327-332, 2015.

ROBAJ, A.; HAMIDI, A.; BYTYQI, H.; SYLEJMANI, D. Frequency and antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from caseous lymphadenitis in sheep in Kosovo. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 23, n. 6, p. 1033-1036, 2017.

RODRIGUES, S. M.; DEMOKRITOU, P.; DOKOOZLIAN, N.; HENDREN, C. O.; KARN, B.; MAUTER, M. S.; SADIK, O. A.; SAFARPOUR, M.; UNRINE, J. M.; VIERS, J.; WELLE, P.; WHITE, J. C.; WIESNER, M. R.; LOWRY, G. V. Nanotechnology for sustainable food production: promising opportunities and scientific challenges. **Environmental Science: Nano**, v. 4, n. 4, p. 767-781, 2017.

RUIZ, J. C.; D'AFONSECA, V.; SILVA, A.; ALI, A.; PINTO, A. C.; SANTOS, A. R. et al. Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e18551, 2011.

SANTIAGO, L. B.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; DOS SANTOS, V. W. S.; RODRIGUES, A. S.; LIMA, A. M. C.; DE OLIVEIRA, E. L.; DE ALBUQUERQUE, F. H. M. A. R. In vivo evaluation of antiseptics and disinfectants on control of Caseous Lymphadenitis: clinical, haematological, serological and microbiological monitoring. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 273-280, 2013.

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. Biogenic Silver Nanoparticles as a Post-Surgical Treatment for *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Small Ruminants. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 824, 2019.

SAUERMAN, R.; KARCH, R.; LANGENBERGER, H.; KETTENBACH, J.; MAYER-HELM, B.; PETSCH, M.; JOUKHADAR, C. Antibiotic abscess penetration: fosfomicin levels measured in pus and simulated concentration-time profiles. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4448-4454, 2005.

SELLERA, F. P.; GARGANO, R. G.; LIBERA, A. M. M. P. D.; BENESI, F. J.; AZEDO, M. R.; DE SÁ, L. R. M. RIBEIRO, M. S.; BAPTISTA, M. S.; POGLIANI, F. C. Antimicrobial photodynamic therapy for caseous lymphadenitis abscesses in sheep: report of ten cases. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 13, p. 120-122, 2016.

SENTURK, S.; TEMIZEL, M. Clinical efficacy of rifamycin SV combined with oxytetracycline in the treatment of caseous lymphadenitis in sheep. **Veterinary record**, v. 159, n. 7, p. 216, 2006.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A. S.; PACHECO, L. G.; PORTELA, R. W.; BASTOS, B. L.; DORELLA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M. G.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. **Research in veterinary science**, v. 88, n. 1, p. 50-55, 2010.

SILVEIRA, R. O.; MACHADO, J. P.; SILVEIRA, C. O. LINFADENITE CASEOSA EM CAPRINOS. **ANAIS SIMPAC**, v. 3, n. 1, 2015.

SKAPETAS, B.; BAMPIDIS, V. Goat production in the World: present situation and trends. **Livest Res Rural Dev**, v. 28, n. 11, p. 200, 2016.

STANISIC, D.; FREGONESI, N. L.; BARROS, C. H. N.; PONTES, J. G. M.; FULAZ, S.; MENEZES, U. J.; NICOLETI, J. L.; CASTRO, T. L. P.; SEYFFERT, N.; AZEVEDO, V.; DURÁN, N.; PORTELA, R. W.; TASIC, L. NMR insights on

nano silver post-surgical treatment of superficial caseous lymphadenitis in small ruminants. **RSC advances**, v. 8, n. 71, p. 40778-40786, 2018.

STEFANSKA, I.; GIERYNSKA, M.; RZEWUSKA, M.; BINEK, M. Survival of *Corynebacterium pseudotuberculosis* within macrophages and induction of phagocytes death. **Pol J Vet Sci**, v. 13, n. 1, p. 143-9, 2010.

TRIPATHI, B. N.; KUMAR, J.; SONAWANE, G. G.; KUMAR, R.; DIXIT, S. K. Microbiological and Molecular Investigation of Clinically Suspected Caseous Lymphadenitis Cases in Goats. **Agricultural research**, v. 5, n. 4, p. 413-419, 2016.

UMER, M.; ABBA, Y.; ABDULLAH, F. F. J.; SALEH, W. M. M.; HARON, A. W.; SAHAREE, A. A.; ARIFF, A. B.; BAIEE, F. H. A.; HAMBALI, I. U.; SHARIF, A. Caseous lymphadenitis in small ruminants: An overview on reproductive implications. **Int. J. Vet. Sci. Anim. Husb**, v. 2, p. 23-31, 2017.

UNDERWOOD, C.; VAN EPS, A. W. Nanomedicine and veterinary science: The reality and the practicality. **The Veterinary Journal**, v. 193, n. 1, p. 12-23, 2012.

WAECKERLE-MEN, Y.; GROETTRUP, M. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 3, p. 475-482, 2005.

WAGNER, C.; SAUERMAN, R.; JOUKHADAR, C. Principles of antibiotic penetration into abscess fluid. **Pharmacology**, v. 78, n. 1, p. 1-10, 2006.

WASHBURN, K. E.; FAJT, V. R.; LAWHON, S. D.; ADAMS, L. G.; TELL, L. A.; BISSETT, W. T. Caprine abscess model of tulathromycin concentrations in interstitial fluid from tissue chambers inoculated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* following subcutaneous or intrachamber administration. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 12, p. 6295-6304, 2013.

WINDSOR, P. A.; BUSH, R. D. Caseous lymphadenitis: Present and near forgotten from persistent vaccination? **Small Ruminant Research**, v. 142, p. 6-10, 2016.

SEGUNDA PARTE

1. ARTIGO

Estudo da farmacocinética plasmática de cloxacilina nanoestruturada e penetração do fármaco em abscessos causados por *Corynebacterium pseudotuberculosis*

O artigo foi redigido segundo as normas da revista *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*

Study of nanostructured cloxacillin plasma pharmacokinetics and drug penetration in abscesses caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*

João Vitor Fernandes Cotrim de Almeida¹, Marcos Ferrante¹, Patrícia Yoshida Faccioli-Martins², Juliana Carine Gern³, Vanessa Carla Furtado Mosqueira⁴, Michelle Daiane de Almeida Loures³, Isabella Bitencourt Guimarães³, Geovana de Carvalho Onorato³, Alessandro de Sá Guimarães^{1,3} and Humberto de Mello Brandão^{1,3*}

¹Federal University of Lavras, Department of Veterinary Medicine, Lavras, Minas Gerais

²Brazilian Agricultural Research Corporation Unit Goats and Sheep, Sobral, Ceará

³Brazilian Agricultural Research Corporation Unit Dairy Cattle, Juiz de Fora, Minas Gerais

⁴Federal University of Ouro Preto, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Ouro Preto, Minas Gerais

Correspondence

Humberto Brandão, Brazilian Agricultural Research Corporation Unit Dairy Cattle, Laboratory of Nanotechnology, Juiz de Fora, MG

Abstract

Caseous lymphadenitis is an infectious and zoonotic disease caused by the facultative intracellular bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. The condition affects small ruminants worldwide, causing significant reduction in milk, wool and meat production. Considering the current therapeutic approaches, encapsulated lesions on superficial lymph nodes are the most important barrier for penetration of antibiotics into the infection site. Accordingly, the objective of this study was to evaluate the pharmacokinetics of cloxacillin-loaded polymeric nanospheres (CLXNP). Ten Toggenburg female goats, naturally infected with *C. pseudotuberculosis*, were distributed into four groups, according to the drainage time of the abscess content: 3, 6, 24 and 48 hours after subcutaneous administration of 1.81 mg/kg of CLXNP in the peri-abscess region. CLXNP exhibited sizes of 188.41 ± 49.34 nm, polydispersity index of 0.181 ± 0.07 and zeta potential of -33.93 ± 6.42 mV. At the *in vitro* assay, for 4 µg/ml of CLXNP there was a reduction of 96.5 and 89 % in bacterial count at

intracellular and extracellular compartments, respectively. Cloxacillin concentration in the abscess was much higher than the *in vitro* inhibitory concentration, even after the antibiotic was no longer detected in the circulatory system. The data are promising for the development of an alternative therapeutic approach.

Introduction

Caseous lymphadenitis (CL) is a chronic and infectious disease that affects small ruminants, with worldwide distribution and zoonotic potential. The condition is an important cause of economic losses due to animal weight loss, decreased milk production, carcass condemnation, leather damage and, eventually, death of affected individuals. It is caused by the Gram-positive, facultative intracellular and non-sporulated bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Clinically, CL is characterized by the formation of suppurative granulomas (abscesses) in one or more lymph nodes, especially in the regions of head, jaw, neck, shoulders and flank/croup (MINOZZI et al., 2016). Despite the sensitivity to a wide range of antibiotics at *in vitro* assays, *C. pseudotuberculosis* is refractory to antibiotic therapy *in vivo*. The refractoriness is attributed to low concentrations of antibiotics in the infection site, due to the fibrous wall of abscesses and the limited intracellular penetration of drugs (BAIRD & MALONE, 2010).

Therefore, efforts for prevention and control of CL in small ruminants are mostly based on surgical treatment of external lesions, followed by chemical cauterization of internal abscess surface and/or prolonged antibiotic therapy. Surgical drainage of abscesses, however, creates a potential hazard of purulent material spreading to fomites and to the environment, especially during the convalescent period (WASHBURN et al. 2013).

Cloxacillin (CLX) is a semisynthetic penicillinase-resistant penicillin, and member of the isoxazolyl penicillins family, that has a broad spectrum of activity (DOI & CHAMBERS, 2015). Despite of CLX being extensively used in both veterinary and human medicine, and the previous reports of *C. pseudotuberculosis* susceptibility to the antibiotic at *in vitro* assays (AL-TRAIF et al.; ROBAJ et al., 2017), the clinical applicability in therapeutic protocols for human lymphadenitis is not sufficiently reported yet, except for ten occupational cases from Australia (PEEL et al., 1997). The restricted acceptance of CLX can be partly explained by the

controversial aspect of penicillins penetration and retention in phagocytic cells (BONGERS et al., 2019).

The use of nanocarriers is an efficient and promising pharmacotechnical alternative to promote drug targeting to specific cell, tissue and organ. To penetrate multiple cellular barriers, antibiotic nanocarriers can be designed to target phagocytic cells, improving intracellular retention and increasing therapeutic efficacy, whereas minimizing development of bacterial resistance (LI et al., 2017). In veterinary medicine, this approach is insufficiently explored; nevertheless, CLX polymeric nanoparticles were successfully administered to cows and sheep with mastitis (ARAÚJO et al., 2019; ZAFALON et al., 2018).

Based on previous reports of our group (ARAÚJO et al., 2019), that polymeric nanoparticles have the capacity to deliver, *in vitro*, CLX molecules to phagocytic cell, it was hypothesized that CLX can remain retained within CL abscess even after bloodstream clearance. To evaluate the hypothesis, 1.81 mg/kg of cloxacillin-loaded polymeric nanospheres (CLXNP) were administered subcutaneously, in the peri-abscess region of goats naturally infected with *C. pseudotuberculosis*. CLX concentrations were measured in blood plasma, and pus was drained from abscesses to 48 hours following drug injection.

Material and Methods

Animals, housing and experimental design

A total of ten Toggenburg female goats (9 months to 3 years of age), naturally infected with *C. pseudotuberculosis*, were used in this study (approved by the Embrapa Animal Care and Use Committee). Each individual was examined, and the corresponding abscess evaluated and measured, by a veterinarian. All the animals were weighed, housed in individualized stalls, fed with 0.5 kg of commercial feed and corn silage, and had access to *ad libitum* water.

Standards, materials and reagents

CLX Pharmaceutical Secondary Standard (PHR1922), dicloxacillin (D9016), Pluronic® F68 (P5556), Span®80 (S6760), RPMI medium (R5886) and PBS buffer (P5493) were purchased from Sigma-Aldrich; methanol and acetonitrile from

J.T.Baker; poly (ϵ -caprolactone) spheres (CAPA 6500) and CLX benzathine from, respectively, MCassab and Hebei Huari Pharmaceuticals Co., Ltd.

Cloxacillin nanoparticles production and characterization

CLXNP were produced according to a previously described procedure (modified technique of ARAÚJO et al., 2019). Nanostructures were prepared with 0.6 % weight per volume (w/v) of poly (ϵ -caprolactone), 1 mg/ml of CLX benzathine and 0.5 % w/v of Span®80, all diluted in 10 mL of a methanol/acetone (1:3) mixture. The organic solution was gradually poured into 20 ml of aqueous solution, containing Pluronic® F68 (0.75 % w/v) in ultrapure water, then stirred for 10 minutes. Lastly, the suspension was concentrated by evaporation technique under reduced pressure. Nanoparticles were then characterized by Dynamic Light Scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK) and Atomic Force Microscopy (EasyScan 2, NanoSurf, Swiss), with a Tap 190Al-G probe (Budget-Sensors, Bulgaria) in tapping mode.

***In vitro* assay**

Blood samples were collected, from a single animal, in eight EDTA vacuum tubes, which were centrifuged (10 min at 380 g and 25 °C) for plasma separation. Leukocytes were collected from all the tubes, and transferred to a falcon tube with 10 ml of 0.84 % ammonium chloride, without homogenization. Subsequently to three centrifugation and two resuspension procedures, the cell pellet was suspended with 10 ml of PBS buffer, and from each tube the macrophages were suspended with 7.5 ml of RPMI medium and 5 % of fetal bovine serum.

Cell counting was performed in a Neubauer chamber under a light microscope; live (unstained) and dead (stained) cells were differentiated by trypan blue staining. The maturation process, in a 5 % CO₂ atmosphere at 37 °C, was completed after 48 h.

To determine *C. pseudotuberculosis* sensibility to CLXNP, the viability of extracellular and intracellular bacteria was assessed by plate count (blood agar), after 24 h of macrophages exposition to the pathogen and at different concentrations of the antibiotic (DORELLA et al., 2006; VALDIVIA et al., 2013).

Intracellular CLX delivery and retention were performed in accordance with Van Bambeke et al. (2003) modified technique. Approximately 2.000.000 caprine

macrophages per well were exposed to 0.026 mg/ml of nanoencapsulated CLX for 2 h, and subsequently subjected to two washing cycles with PBS buffer, for removal of non-phagocytized nanoparticles. All the assays were performed in duplicate, and intracellular CLX was quantified by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS) after well washing, 2 and 24 h after antibiotic application.

Plasma and pus sample preparation

Precisely 1.81 mg/kg of CLXNP were subcutaneously administered around each abscess. The dosage was determined according to the prescription for large animals in Eghianruwa (2014). From the contralateral jugular vein 5 ml of blood were collected, in EDTA vacuum tubes, at 0.25, 0.5, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 24 and 48 h after CXNP administration, and then centrifuged. Pus from the abscesses was collected by drainage, at 3, 6, 24 and 48 h following drug injection. CLXNP were quantified in both biological matrices by UPLC-MS/MS.

Samples were extracted by liquid-liquid extraction, using methanol as solvent extractor, and clean-up. The ratio used to perform matrix and solvent extraction was 1:9. The extracts were obtained after removal of the protein precipitates by centrifugation (8 min at 22000 g and 5°C). Analysis was performed on the supernatant of each sample.

Instrumental parameters

LC-MS/MS analysis was performed using UPLC Acquity (Waters Inc., USA) equipped with Vanguard C18 pre-column and BEH-C18 column (2.1 x 100 mm, 1.7 µm particle size - Waters Inc., USA), coupled to a MS XEVO-TQS micro mass spectrometer (Waters Inc., USA) equipped with Electrospray Ionization (ESI) source and triple quadrupole mass analyzer.

The chromatographic conditions established for identification and quantification of CLX were: mobile phase flow of 0.3 ml/min; column temperature of 50 °C; mobile phases A, with 0.1 % of formic acid, and B, with methanol; running in gradient mode from 0 to 3 min, with 50 % A and 50 % B; from 3.01 to 4 min, with 1 % A and 99 % B; from 4.01 to 5 min, with 50 % A and 50 % B; injection volume of 3.0 µl. The internal standard was adapted from dicloxacillin molecules.

The spectrometric conditions were defined as: negative ionization mode; capillary voltage of 3.0 kV; 20 V of cone potential; nebulisation temperature of 450 °C; nebulisation gas flow of 810 l/min; cone gas flow of 150 l/h; collision energy of 8 V for ion formation (390 m/z); collision energy of 14 V for ion fragmentation (293 m/z).

Method validation parameters included a limit of quantitation of 0.5 ng/ml, detection limit of 0.05 ng/ml, recovery at 1 ng/ml of 81.28 %, and a relative standard deviation of 21.75 %.

Analysis of pharmacokinetics data

Pharmacokinetic parameters were analyzed, for each animal, applying non-compartmental analysis in PKSolver, a validated Microsoft Excel add-on (ZHANG et al., 2010). The maximum plasma concentration (C_{max}) and the time to reach maximum concentration (T_{max}), as well as plasma half-life ($T_{1/2}$), volume of distribution (Vd) and clearance rate (CL) were calculated directly from the collected data. Area under the curve were estimated, from 0 to the last measured point ($AUC_{0 \rightarrow last}$), with the linear fit of the natural log, adopting the trapezoidal rule. For the abscesses, C_{max} and T_{max} were determined considering the above-mentioned method for blood plasma.

Descriptive statistics were generated from the final dataset, for the following pharmacokinetic outcomes: C_{max} , T_{max} , $AUC_{0 \rightarrow last}$, $T_{1/2}$, Vd and CL.

Results

One animal was used only for calibration of LC-MS/MS analysis equipment. The goat had only its blood sample collected, as it was not diagnosed with caseous lymphadenitis. Concerning the infected animals, one had its abscess CLX concentration removed from the results, because instead of purulent material (nonexistent) a sample of the fibrous capsule was collected.

CLXNP exhibited average hydrodynamic radius of 188.41 ± 49.34 nm, with nanoparticles ranging from 78.82 to 458.7 nm in size (Figure 1.A). The polydispersity index (PDI) and zeta potential were 0.181 ± 0.07 and -33.93 ± 6.42 mV, respectively. In AFM technique, CLXNP presented spherical shape and a similar size to DLS analysis result (Figure 1.B).

For 4 µg/ml of CLXNP there was a reduction of 96.5 and 89 % in colony forming units at intracellular and extracellular compartment assays, respectively. Intracellular CLX retention 2 h after well washing was 6 ± 4 ng per one million cells, and 24 h post-washing the CLX retention was 0.6 ± 0.004 ng per one million cells.

Mean estimated pharmacokinetic parameters (C_{\max} , T_{\max} , $T_{1/2}$, $AUC_{0 \rightarrow \text{last}}$, V_d and CL) are presented, for each individual, in Table 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of CLXNP against clinical isolates of *C. pseudotuberculosis*, the mean CLXNP plasma concentration, and CLXNP pus concentrations analyzed at each sampling point, are presented in Figure 2.

Table 2 shows CLX concentration values at 3, 6, 24 and 48 h after antibiotic application, in the abscess and blood plasma from the same animal. Concentrations were similar at 3 and 6 h, whereas at 24 and 48 h CLX concentrations in suppurative granulomas were substantially higher than in the bloodstream, for the respective animals.

Figure 1 Representative analysis of cloxacillin-loaded polymeric nanospheres (CLXNP) used in the experiment: Dynamic Light Scattering (A) and Atomic Force Microscopy (B)

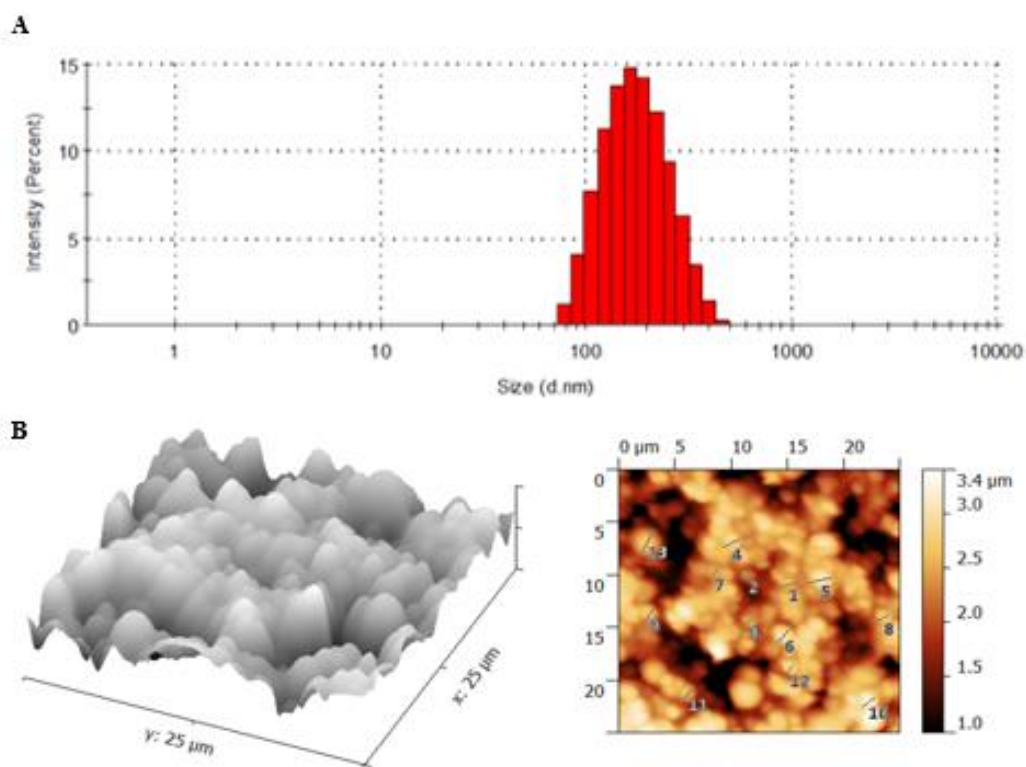


Figure 2 Mean (\pm SD) plasma concentration and abscess concentrations, for each Toggenburg goat, of cloxacillin-loaded polymeric nanospheres, following subcutaneous administration of the antibiotic (1.81 mg/kg) in the peri-abscess region, and Minimum Inhibitory Concentration (MIC = 4 μ g/ml) against clinical isolates of *C. pseudotuberculosis* analyzed in vitro

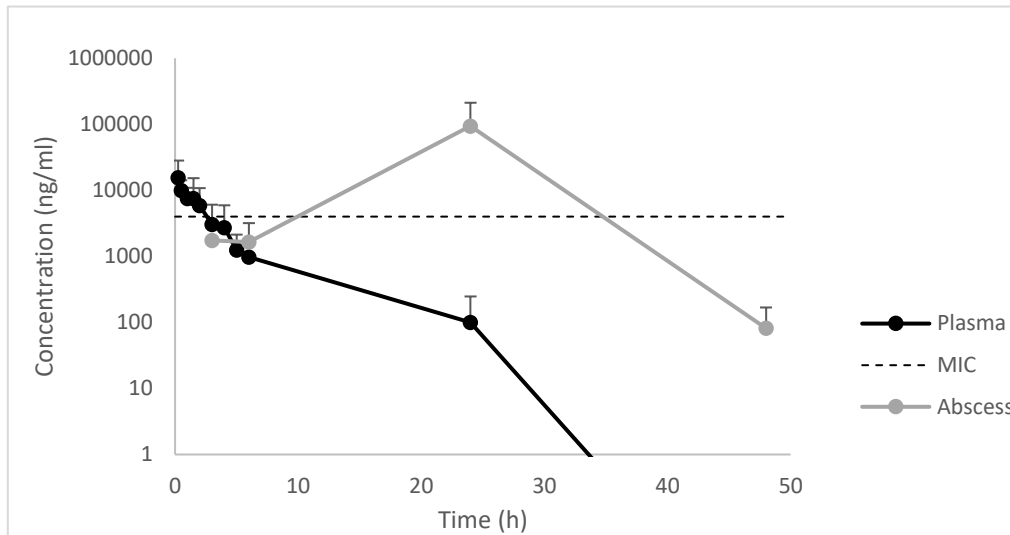


Table 1 Cloxacillin-loaded polymeric nanospheres pharmacokinetic parameters in plasma of Toggenburg goats, after a single dose (1.81 mg/kg) administered subcutaneously in the peri-abscess region. Non-compartmental analysis applied in PKSolver

Parameter	Unit	Goat 1	Goat 2	Goat 3	Goat 4	Goat 5	Goat 6	Goat 7	Goat 8	Mean	SD
C_{max}	ng/ml	25447,0	14776,9	13721,3	10270,6	2058,3	8487,0	43761,5	12312,0	16354	12889
T_{max}	hr	1,5	0,3	0,3	2,0	0,5	0,3	0,3	0,3	0,66	0,69
$T_{1/2}$	hr	1,268	1,370	2,360	1,416	3,180	2,276	1,988	2,260	2,01	0,65
$AUC_{0 \rightarrow last}$	ng-hr/ml	63835,8	33605,8	11222,9	47578,8	7672,8	27285,1	53232,5	58551,8	37873	21329
Vd (area)/kg	ml/kg	51,9	106,5	549,1	77,7	1082,6	217,9	97,5	100,8	285	360
CL (area)/kg	ml/hr/kg	28,354	53,859	161,272	38,042	235,885	66,336	34,002	30,913	81	76

Notes. C_{max} : observed maximal concentration; T_{max} : time at observed maximal concentration; $T_{1/2}$: elimination half-life estimated from the terminal time-concentration curve; $AUC_{0 \rightarrow last}$: area under the curve from time zero to the last sample time; Vd : volume of distribution; CL : clearance rate; SD : standard deviation.

Table 2 Comparison of CLX concentrations in abscess and blood plasma at 3, 6, 24 and 48 h after subcutaneous antibiotic application in the peri-abscess region, for each animal used in the experiment

Time	Plasma (ppb)	Abscess (ppb)
3 h	1994.5	1744.0
6 h	899.5	105.5
	257.0	3188.2
	1392.0	1645.6
24 h	< LOQ	177480.4
	< LOQ	10807.3
48 h	< LOD	20.1
	< LOD	143.0

Notes. At 3 h there was one individual, at 6 h there were three animals, and at 24 and 48 h there were two goats in each time; LOQ: limit of quantification; LOD: limit of detection.

Discussion and Conclusion

The nanoparticles used in the experiment were similar in shape and size to those produced by Araújo et al. (2019). Considering that the measured PDI was less than 0.3, the suspension was considered monodisperse (DANAIEI et al., 2018). Zeta potential express, numerically, the surface electrical charge of a nanoparticle. Into suspension, nanoparticles with modulus of zeta higher than 30 mV are electrically stable due to electrostatic repulsion, preventing their aggregation, coagulation or flocculation in a given fluid (LOWRY et al., 2016). Therefore, based on the calculated zeta potential, it can be inferred that the suspension used had colloidal stability.

The dosage determined according to Eghianruwa (2014) was inferior to the one administered intravenously to a human patient diagnosed with vertebral osteomyelitis (QUILES et al., 2000), and single application of benzathine cloxacillin was already tested for infectious bovine keratoconjunctivitis outbreaks (WARD & CLARK, 1991).

Prior to *in vivo* assay, the group conducted a phagocytosis study in goat macrophages to demonstrate CLXNP delivery efficiency. The retention capacity of CLX within these cells, as well as the intracellular CLXNP activity against *C. pseudotuberculosis* were successfully demonstrated. The data corroborate with previous results obtained with macrophage-like J774-A (ARAÚJO et al., 2019).

As indicated in Figure 2, after 24 h of CLXNP application, the concentration of CLX in the abscess (pus) varied considerably, decreasing as it changed from fluid to pasty aspect. The capacity to penetrate the abscess wall and reach the cytoplasm of phagocytic cells are the major obstacles to the employment of antibiotic therapy for the treatment of caseous lymphadenitis (BAIRD & MALONE, 2010; STANISIC et al., 2018). The limitation of the efficacy of such approach could be related: 1 - inability of certain pharmacological bases to penetrate the cell membrane and/or to remain within phagocytic cells (KAMRUZZAMAN et al., 2017); 2 - anatomical constitution of abscesses from *C. pseudotuberculosis* infection, which are usually situated inside a superficial lymph node, and composed of multifocal areas of caseous material internally, thick zone of neutrophils, macrophages, lymphocytes and histiocytes, and connective tissue in proliferative phase externally (HASSAN et al., 2012).

Beta lactam antibiotics can easily pass through the cell membrane, especially due to low molecular weight and moderate lipophilicity (KAMRUZZAMAN et al., 2017). However, they may have low retention rate in phagocytic cells, with an intracellular and extracellular antibiotic ratio of less than 1 (BONGERS et al., 2019). Molecules incapacity of accumulation inside the cell is partly explained by efflux pump mechanisms, which eject the drug out of the intracellular environment. (BONGERS et al., 2019; VAN BAMBEKE et al., 2003). Consequently, there are few reports of the successful use of CLX in the treatment of abscesses caused by *C. pseudotuberculosis* - only ten human cases in Australia, in which therapeutic protocols were considerably extensive (PEEL et al., 1997).

It is known that both size and zeta potential are crucial to determine nanoparticle cell uptake. According to Swartz et al. (2001), nanoparticles ranging from 10 to 100 nm in size can easily cover the cellular interstice after subcutaneous administration, thereby reaching the lymphatic system and targeting lymph node resident dendritic cells (DC). On the other hand, nanoparticles larger than 100 nm tend to be phagocytized by peripheral antigen-presenting cells, considering that periferic DC have tropism for particles between 100 and 200 nm. Macrophages, which have higher phagocytic capacity, have tropism for material ranging from 200 to 600 nm (KANCHAN & PANDA, 2007; SWARTZ et al., 2001). Due to the large surface area/volume ratio and surface negative charge, CLXNP can be rapidly opsonized and cleared by phagocytic cells (HONARY & ZAHIR, 2013). Considering that abscesses

caused by *C. pseudotuberculosis* are notably located in superficial lymph nodes, and have a great number of phagocytic cells inside, it is possible to hypothesize that after subcutaneous application of the antibiotic, CLXNP that escaped phagocytosis were responsible for CLX plasma levels whereas CLXNP phagocytized by resident DC cells and phagocytic cells, which contribute to formation of the anatomical structure of the abscess, were responsible for the high retention of the drug in the pus.

CLXNP administered subcutaneously had longer apparent elimination half-life inside abscesses than in blood plasma, suggesting that the antibiotic is gradually released from connective tissue to granulomatous lesions. In order to effectively overcome the barriers to antibiotic penetration in suppurative granulomas of caseous lymphadenitis, high plasma antibiotic concentrations are required (SAUERMAN et al., 2005). Although the lymph node compartment represents the target area for the pathogen that causes caseous lymphadenitis, there is a paucity of existing data on the necessary PK/PD relationship and MIC values necessary for effective treatment or prevention of *C. pseudotuberculosis* infection in goats.

Unpublished studies of our group achieved, for two bacterial isolates of caprine origin and two of ovine origin, a MIC of 4 µg/ml for the nanostructured CLX formulation. The concentration of CLX in abscesses drained 24 h after antibiotic application was extremely high, as shown in Figure 2, comprising values above MIC from approximately 8 to 36 h post-injection.

Pharmacokinetic parameters were considerably different in blood plasma and pus. The mean maximum plasma concentration was 16354 ng/ml (\pm 12889) and 62820 ng/ml in the purulent exudate. The mean time to maximum concentration was 0.66 h in blood plasma and 24 h for pus, which was sampled once from each individual by surgical drainage of the abscess. Mean apparent elimination half-life of CLXNP was 2.01 h (\pm 0.65) in blood plasma. Direct correlation between the two biological matrices is relatively intricate, however, objective comparison indicates that pharmacokinetics in the blood plasma of Toggenburg female goats is dramatically different from the parameters analyzed for CLXNP in the purulent material. Based on the *in vivo* results, there is evidence that CLX presented, in abscesses purulent content, a concentration profile distinct from that shown in blood plasma, indicating drug retention in that compartment.

PK/PD modelling of penicillin-based beta-lactams report time-dependent outcomes (AHMAD et al., 2016), for which concentrations above the MIC for 50 %

of the interval between doses are necessary for maximum effects (KUTI, 2016). Considering that the concentration of the antibiotic inside the abscess was above the MIC of 4 µg/ml from approximately 8 to 36 h post-injection, the administration of CLXNP in the subcutaneous peri-abscess region every 24 h could be considered as a practical and effective therapeutic protocol. Within the interval between doses, free drug concentrations would be considerably above the MIC in the infection site, mitigating reinfection and environment contamination rates.

In conclusion, CLXNP have a remarkably therapeutic potential for treatment of caseous lymphadenitis, considering that the drug concentration, inside suppurative granulomas (abscesses), was higher than MIC value for estimated *in vitro*. Furthermore, the preliminary data can be used as a guide for a larger clinical study in goats infected with *C. pseudotuberculosis*, not only to define a dose, but also a therapeutic regimen for the treatment of caseous lymphadenitis with CLXNP.

Acknowledgments

This work was supported by FAPEMIG and CNPq. We would like to thank Rede Agronano, Rede de Pesquisa e Inovação para Bioengenharia de Nanossistemas and Complexo Multiusuário de Bioeficiência da Pecuária.

Conflict of Interest

All authors state that they have no conflict of interest.

Author Contribution

J.A., P.M., A.G. and H.B. conceived and designed research; J.A., P.M., M.L., I.G. and G.O. performed experiments; J.A. and G.O performed drug assays; M.F. performed pharmacokinetic analysis; J.A., M.F., M.L. and H.B. analyzed data and interpreted results; J.A, M.F. and H.B. edited and revised manuscript; P.M., M.F., A.G. and H.B. approved final version of manuscript.

ORCID

João Vitor F. C. de Almeida (<https://orcid.org/0000-0002-9931-7838>)

References

- Ahmad, I., Huang, L., Hao, H., Sanders, P., & Yuan, Z. (2016). Application of PK/PD modeling in veterinary field: dose optimization and drug resistance prediction. *BioMed research international*, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5465678>
- Al-Traif, B., Housawi, F. M. T., Salem, M. A., Al-Saktawi, K. A., & Fadlelmula, A. (2017). Small Ruminants Abscesses: Bacterial Etiology, Antibiogram and Haematological Study in the East of Saudi Arabia. *Microbiology Research Journal International*, 1-11. <https://doi.org/10.9734/MRJI/2017/38366>
- Araújo, R. S., Garcia, G. M., Vilela, J. M. C., Andrade, M. S., Oliveira, L. A. M., Kano, E. K., & Mosqueira, V. C. F. (2019). Cloxacillin benzathine-loaded polymeric nanocapsules: Physicochemical characterization, cell uptake, and intramammary antimicrobial effect. *Materials Science and Engineering: C*, 104, 110006. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110006>
- Baird, G. J., & Malone, F. E. (2010). Control of caseous lymphadenitis in six sheep flocks using clinical examination and regular ELISA testing. *Veterinary Record*, 166(12), 358-362. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.b4806>
- Bongers, S., Hellebrekers, P., Leenen, L. P., Koenderman, L., & Hietbrink, F. (2019). Intracellular Penetration and Effects of Antibiotics on Staphylococcus aureus Inside Human Neutrophils: A Comprehensive Review. *Antibiotics*, 8(2), 54. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020054>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Doi, Y., & Chambers, H. F. (2015). Penicillins and β -Lactamase Inhibitors. In: *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, 8th edition, 263-277.
- Dorella, F. A., Pacheco, L. G. C., Oliveira, S. C., Miyoshi, A., & Azevedo, V. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Veterinary research*, 37(2), 201-218. <http://doi.org/10.1051/vetres:2005056>

- Eghianruwa, K. (2014). *Essential Drug Data for Rational Therapy in Veterinary Practice*. AuthorHouse.
- Hassan, S. S., Schneider, M. P. C., Ramos, R. T. J., Carneiro, A. R., Ranieri, A., Guimarães, L. C., & de Castro Soares, S. (2012). Whole-genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain Cp162, isolated from camel. *Journal of Bacteriology*, *194*(20), 5718-5719. <https://doi.org/10.1128/JB.01373-12>
- Honary, S., & Zahir, F. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *12*(2), 265-273. <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.20>
- Kamruzzaman, M., Shoma, S., Thomas, C. M., Partridge, S. R., & Iredell, J. R. (2017). Plasmid interference for curing antibiotic resistance plasmids in vivo. *PLoS One*, *12*(2), e0172913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172913>
- Kanchan, V., & Panda, A. K. (2007). Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials*, *28*(35), 5344-5357. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.015>
- Kuti, J. L. (2016). Optimizing antimicrobial pharmacodynamics: a guide for your stewardship program. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *27*(5), 615-624. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2016.08.001>
- Li, Y., Gao, J., Zhang, C., Cao, Z., Cheng, D., Liu, J., & Shuai, X. (2017). Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for efficient gene delivery. *Polymeric Gene Delivery Systems*, Springer, Cham, 167-215. <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0119-6>
- Lowry, G. V., Hill, R. J., Harper, S., Rawle, A. F., Hendren, C. O., Klaessig, F., & Rumble, J. (2016). Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. *Environmental Science: Nano*, *3*(5), 953-965. <https://doi.org/10.1039/C6EN00136J>
- Minozzi, G., Mattiello, S., Grosso, L., Crepaldi, P., Chessa, S., & Pagnacco, G. (2016). First insights in the genetics of caseous lymphadenitis in goats. *Italian Journal of Animal Science*, *16*(1), 31-38. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2016.1250610>

- Peel, M. M., Palmer, G. G., Stacpoole, A. M., & Kerr, T. G. (1997). Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clinical Infectious Diseases*, 24(2), 185-191. <https://doi.org/10.1093/clinids/24.2.185>
- Quiles, I., Blázquez, J. C., De Teresa, L., Plaza, J., & Medrano, C. (2000). Vertebral osteomyelitis due to *Pasteurella aerogenes*. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 32(5), 566-567. <https://doi.org/10.1080/003655400458929>
- Robaj, A., Hamidi, A., Bytyqi, H., & Sylejmani, D. (2017). Frequency and antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from caseous lymphadenitis in sheep in Kosovo. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 23(6), 1033-1036.
- Stanisic, D., Fregonesi, N. L., Barros, C. H., Pontes, J. G., Fulaz, S., Menezes, U. J., & Durán, N. (2018). NMR insights on nano silver post-surgical treatment of superficial caseous lymphadenitis in small ruminants. *RSC advances*, 8(71), 40778-40786. <https://doi.org/10.1039/C8RA08218A>
- Swartz, S. L., Seabaugh, M. M., Holt, C. T., & Dawson, W. J. (2001). Fuel processing catalysts based on nanoscale ceria. *Fuel Cells Bulletin*, 4(30), 7-10.
- Valdivia, J., Real, F., Acosta, F., Acosta, B., Deniz, S., Ramos-Vivas, J., & Padilla, D. (2013). Interaction of *Corynebacterium pseudotuberculosis* with ovine cells in vitro. *Veterinary pathology*, 50(2), 318-323. <https://doi.org/10.1177/0300985812452579>
- Van Bambeke, F., Michot, J. M., & Tulkens, P. M. (2003). Antibiotic efflux pumps in eukaryotic cells: occurrence and impact on antibiotic cellular pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(5), 1067-1077. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg225>
- Ward, D. A., & Clark, E. S. (1991). Ocular pharmacology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 7(3), 779-791. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)31084-7](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)31084-7)
- Washburn, K. E., Fajt, V. R., Lawhon, S. D., Adams, L. G., Tell, L. A., & Bissett, W. T. (2013). Caprine abscess model of tulathromycin concentrations in interstitial fluid from tissue chambers inoculated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* following

subcutaneous or intrachamber administration. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(12), 6295-6304. <http://doi.org/10.1128/AAC.00936-13>

Zafalon, L. F., Cunha, M. L., Brandão, H. M., Mosqueira, V. C., Santana, R., Barioni Júnior, W., & Pilon, L. E. (2018). Relationship between virulence factor genes in coagulase-negative *Staphylococcus* spp. and failure of antimicrobial treatment of subclinical mastitis in sheep. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(4), 579-585. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-4984>

Zhang, Y., & Solver, P. K. (2010). An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer methods and programs in biomedicine*, 99(3), 306-314. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.01.007>

2. AUTORIZAÇÃO PARA USO DOS ANIMAIS NO EXPERIMENTO



Caprinos e Ovinos

Comissão de Ética no Uso de Animais –
CEUA / CNPC

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação *in vitro* de cloxacilina encapsulada em nanopartícula no tratamento de abscessos causados por *Corynebacterium pseudotuberculosis*", registrada com o Número de protocolo 011/2014, sob a responsabilidade de Patrícia Yoshida Faccioli Martins, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, teve a vigência prorrogada e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS (CEUA/CNPC).

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA
Vigência do projeto	01/04/2014 à 30/11/2018
Espécie	Caprina e Ovina
Número de animais	24
Peso/idade	Adultos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Rebanho da Embrapa Caprinos e Fazendas particulares

Sobral, CE, 30 de abril de 2018.

Dra. Alice Andrioli Pinheiro
Coordenador da CEUA-CNPC

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos e Ovinos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral-Groaíras, Km 4,
CEP 62010-970 Sobral – CE
Telefone (88) 3112.7400 Fax (88) 3112.7455
www.embrapa.br/caprinos-e-ovinos