

---

## AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE CLOXACILINA NANOENCAPSULADA CONTRA DIFERENTES ISOLADOS DE *MORAXELLA*.

---

GERN, J.C.; GUIMARÃES, A.S.; BASSOLI, A.E.G.; HERRMANN, G.P.; VARGAS, A.C.;  
LIBARDONI, F.; MARTINI, C.L.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C.; SOUZA, G. N.; SANTOS,  
F.F.; DA SILVA, S.R.; SILVA, M.A.S.; MOSQUIERA, V.C.F.; BRANDÃO, H. M.

juliana.gern@embrapa.br; alessandro.guimaraes@embrapa.br; annaelizabassoli@gmail.com;  
gederpaulo@hotmail.com; agueda.vargas@gmail.com; felipelibardoni@hotmail.com; saulo.srs@gmail.com;  
carolinemartinet@gmail.com; maria.brito@embrapa.br; carla.lange@embrapa.br; fernanda-  
fs@hotmail.com; marcos.souto@embrapa.br; vamosqueira@gmail.com; humberto.brandao@embrapa.br

**Projeto Componente:** PC5    **Plano de Ação:** PA6

---

### Resumo

A ceratoconjuntivite infecciosa (CIB) é uma doença contagiosa que afeta os olhos dos ruminantes de todas as faixas etárias, causada pela bactéria do gênero *Moraxella*. A concentração mínima inibitória (CIM) da cloxacilina nanoencapsulada, da nanopartícula sem o antibiótico e da cloxacilina pura foram determinadas *in vitro* em amostras de campo de *Moraxella ovis* (5 amostras), *Moraxella bovis* (5 amostras), *Moraxella bovocolli* (1 amostra) e o CIM tanto da cloxacilina convencional quanto da nanoestruturada mostraram-se semelhantes frente a todas as estirpes testadas.

**Palavras-chave:** nanopartículas, cloxacilina, ceratoconjuntivite bovina

---

### Introdução

A ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB) é uma doença que acomete os olhos dos bovinos sendo uma enfermidade ocular, infecciosa e contagiosa, caracterizada por conjuntivite, lacrimajamento e ceratite causada pela bactéria *Moraxella bovis* (GOMES, 2011). Tal enfermidade é 8ª doença que mais causa prejuízo econômico para rebanhos leiteiros bovinos do MERCOSUL (CONCEIÇÃO e TURNES, 2003). Em pequenos ruminantes, casos clínicos de ceratoconjuntivite também são observados por bactérias do mesmo gênero e, causa prejuízos semelhantes.

Tal enfermidade pode ser tratada pela via tópica ocular ou por via parenteral, sendo a primeira de eleição para animais em lactação. Nesse caso, faz-se necessário o uso de múltiplas aplicações para se manter níveis oculares compatíveis com a inibição do crescimento microbiano, o que acaba por aumentar demasiadamente a mão de obra. As drogas mais utilizadas são a gentamicina, eritromicina, oxitetraciclina, cloxacilina (CONCEIÇÃO e TURNES, 2003).

O uso de nanocarreadores mucoadesivos, são uma estratégia alternativa para contornar os inconvenientes do uso da via ocular tópica, uma vez que podem promover a liberação sustentada de princípios ativos na mucosa ocular, reduzindo a necessidade do número de aplicações e mantendo constante a concentração de princípio ativo nesse compartimento biológico (SAHOO et al., 2010).

Assim, o objetivo do presente estudo foi comparar a concentração mínima inibitória de cloxacilina benzatínica incorporada à nanopartículas mucoadesivas frente à cloxacilina livre em isolados de campo de três espécies de *Moraxella*.

---

### Materiais e métodos

Nanocápsulas contendo cloxacilina foram preparadas pela técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado, seguida de evaporação do solvente, segundo metodologia previamente descrita por (MOSQUEIRA et al, 2011).

O tamanho médio e índice de polidispersão (IPD) da partículas foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons a 20°C em um Nanosizer N5Plus Analyser, Beckmann Coulter (Fullerton, USA), enquanto que o potencial Zeta foi

determinado por anemometria laser Doppler em um Zetasizer HS3000 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

A determinação da concentração mínima inibitória (CIM) da cloxacilina nanoencapsulada, da nanopartícula sem o antibiótico e da cloxacilina pura foram determinadas *in vitro* em amostras de campo de *M. ovis* (5 amostras), *M. bovis* (5 amostras), *M. bovocolli* (1 amostra) e um *Staphylococcus aureus* (estirpe ATCC 29213), utilizado como controle de susceptibilidade e de qualidade do teste, cultivadas em caldo Mueller Hinton. Como controle negativo (branco) utilizou-se a nanopartícula pura, sem antibiótico.

Todas as análises laboratoriais foram feitas em duplicata.

## Resultados e discussão

As nanoesferas contendo cloxacilina apresentaram diâmetro médio de 295 nm e uma baixa polidispersão, com IPD de 0,12. O potencial Zeta foi estimado em +42 mV, indicando que as partículas podem ser estáveis em suspensão aquosa por repulsão eletrostática, uma vez que o módulo do potencial Zeta encontra-se muito próximo de 30mV (REIS et al., 2006).

Conforme observado na tabela 1, tanto a cloxacilina livre quanto a cloxacilina nanoencapsulada apresentaram CIM que permitem seu uso em formulações para tratamento da ceratoconjuntivite. Os resultados foram similares para ambas as formulações, considerados positivos, visto que a cloxacilina nanoestruturada apresenta-se encapsulada dentro da nanopartículas, com menor contato com as *Moraxellas* nos testes *in vitro*. No tratamento branco observou-se o livre crescimento bacteriano, indicando que o veículo nanoparticulado não interferiu no crescimento bacteriano.

**Tab1:** Atividade antimicrobiana (*Staphylococcus aureus*, estirpe ATCC 29213) em caldo Mueller Hinton.

Isolado	Concentração mínima inibitória µg/mL		
	NPCLOX	CLOX	Branco
<i>M. ovis 01</i>	0,5	0,5	>64
<i>M. ovis 02</i>	0,5	0,5	>64

<i>M. ovis 03</i>	1	1	>64
<i>M. ovis 04</i>	1	1	>64
<i>M. ovis 05</i>	0,5	0,5	>64
<i>M. bovis 01</i>	1	1	>64
<i>M. bovis 02</i>	0,5	0,5	>64
<i>M. bovis 03</i>	4	4	>64
<i>M. bovis 04</i>	2	2	>64
<i>M. bovis 05</i>	1	1	>64
<i>M. bovocolli</i>	2	2	>64
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5	0,5	>64

NPCLOX = cloxacilina nanoencapsulada; CX = cloxacilina livre; Branco = nanopartícula pura

Tais resultados sugerem que o processo de encapsulamento não promoveu a degradação da cloxacilina. Vale ressaltar que nesse tipo de teste, não há fluidos biológicos, compartimentos ou moléculas que possam reproduzir a biodisponibilidade do antimicrobiano como ocorre no animal e, conseqüentemente, na eficácia deste frente ao patógeno, como ocorre em processos infecciosos.

A principal variável avaliada foi a eficácia do fármaco no meio de cultura frente a diferentes patógenos. Em todos os patógenos não foi identificada diferenças de susceptibilidade. A construção de formulações nanoestruturadas visam melhorar a retenção do fármaco na conjuntiva animal, basicamente pela mucoadesividade dos nanocarreadores. Dessa forma, com o uso de nanocarreadores, espera-se favorecer a posologia do tratamento (menor numero de tratamentos por dia), menor taxa de eliminação do fármaco pela produção de secreções lacrimais, comuns em casos de ceratoconjuntivite e, conseqüentemente, pelo maior tempo de contato com o agente infeccioso, favorecendo a eficácia dos tratamentos de casos clínicos de ceratoconjuntivite em ruminantes, além de menor possibilidade da ocorrência de resíduos no leite e carne dos animais tratados.

---

## Conclusões

---

O CIM tanto da cloxacilina convencional quanto da nanoestruturada mostraram-se semelhantes, o que nos permite inferir que o uso da cloxacilina na forma nanoencapsulada em formulações oftálmicas deva seguir concentrações de antibiótico semelhante às formulações contendo antibiótico livre.

---

## Referências

---

CONCEIÇÃO, F.R.; TURNES, C.G. Moraxella bovis: influência das características genótípicas e fenotípicas no controle da Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina. *Ciência Rural*, v.33, n.4, p.778-787, 2003.

GERHARD, R.R.; ALLEN, J.W.; GREENE, W.H.; SMITH, P.C. Therole of face flies in an episode of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *J. Am. Vet. Med. Ass.* v.180 p.156-159, 1982.

GOMES, M.J.P. Moraxella bovis. *Microbiologia Clínica Veterinária. Área de bacteriologia 2011-2.* (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - Arquivos PDF de Bacteriologia Veterinária 2000-2). UFRGS, 2011.

MOSQUEIRA, V. C. F.; ARAUJO, R. S.; BRANDAO, H. M. Nanoparticulate Composition Containing Antibiotics Composition Containing Antibiotics For Intramammary Administration In Animals. WIPO: US Patent. WO/2011/150481, 2011.

REIS, C. P. ; NEUFELD, R. J. ; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.*, v. 2, n.1, p. 8-21, 2006.

SAHOO, S.; SAHOO, R.; NANDA, R.; TRIPATHY, M. K.; NAYAK, P. L. Mucoadhesive Nanopolymer – A Novel Drug Carrier for Topical Ocular Drug Delivery. *European Journal of Scientific Research*. v.46, n.3, pp.401-409, 2010.