



JÚLIA MARQUES DA SILVA MAIA

**UTILIZAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO DE
CLOXACILINA NANOESTRUTURADA NO
TRATAMENTO DA CERATOCONJUNTIVITE
INFECCIOSA BOVINA**

LAVRAS – MG

2015

JULIA MARQUES DA SILVA MAIA

**UTILIZAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO DE CLOXACILINA
NANOESTRUTURADA NO TRATAMENTO DA
CERATOCONJUNTIVITE INFECCIOSA BOVINA**

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

Orientador

Dr. Alessandro de Sá Guimarães

Coorientadores

Dr. Humberto de Mello Brandão

Dr. Raimundo Vicente de Sousa

LAVRAS – MG

2015

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

Maia, Júlia Marques da Silva.

Utilização de uma formulação de cloxacilina nanoestruturada para o tratamento da ceratoconjuntivite infecciosa bovina / Júlia Marques da Silva Maia. – Lavras : UFLA, 2015.

78 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Alessandro de Sá Guimarães.

Bibliografia.

1. Nanopartículas mucoadesivas. 2. Pinkeye. 3. Tratamento tópico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

JULIA MARQUES DA SILVA MAIA

**UTILIZAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO DE CLOXACILINA
NANOESTRUTURADA NO TRATAMENTO DA
CERATOCONJUNTIVITE INFECCIOSA BOVINA**

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

APROVADA em 25 de março de 2015.

Dr. Geraldo Marcio da Costa	UFLA
Dr. Marcos Bryan Heinemann	USP
Dr. Humberto de Mello Brandão	EMPRAPA

Dr. Alessandro de Sá Guimarães
Orientador

LAVRAS – MG

2015

Aos meus pais, Elizabeth e Alberto, exemplos de vida, pelo amor incondicional e por me darem toda a base que me permitiu alcançar os meus objetivos.

Aos meus irmãos Alberto, Álvaro, Rafael e Lúcia, meus cunhados, Janine, Marcelo e Juliane, e meus sobrinhos Rodrigo, Lucas e Letícia, pelo companheirismo, amizade, carinho e confiança depositada em mim em todos os momentos.

Ao meu companheiro, Wellington, pelo amor, incentivo e todo apoio de sempre.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e à Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade de realização do mestrado.

À CAPES, pelo auxílio financeiro com a bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Alessandro de Sá Guimarães pela orientação, paciência, dedicação e por acreditar no meu potencial.

Aos meus coorientadores, Humberto de Mello Brandão e Raimundo Vicente de Souza, pelos ensinamentos, atenção e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pelas contribuições na minha formação profissional.

À pesquisadora, Anette O'Connor (Iowa State University) pela colaboração.

Aos pesquisadores, funcionários e estagiários da Embrapa Gado de Leite, pela recepção e auxílio.

Aos colegas de laboratório, Bruna, Cynthia, Érica e Saulo, cujo apoio foi essencial para que esse trabalho se concretizasse.

Aos colegas de mestrado, em especial Bruna, Camila e Juliana, por dividirem comigo as angústias e alegrias nesse período.

A minha família, pela motivação, compreensão, amor e por sempre apostar no meu sucesso.

Ao meu noivo, Wellington, por não me deixar desistir, nos momentos de desânimo.

Agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida, por me dar forças para superar os obstáculos.

RESUMO GERAL

A ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB) é uma importante afecção ocular dos bovinos. Um dos grandes desafios da CIB é o seu tratamento, uma vez que tanto as formulações tópicas quanto parenterais apresentam diversos inconvenientes. A aplicação de fármacos parenterais tem um período de carência maior e podem deixar resíduos no leite e na carne. Já a aplicação tópica é, muitas vezes, impossibilitada pela dificuldade de manejo, uma vez que são necessárias várias aplicações. Para contornar as limitações de tratamento, foi avaliado o uso de uma formulação nanoestruturada de cloxacilina. A CIB foi induzida experimentalmente em 46 bovinos, puros e mestiços, distribuídos em 3 grupos de forma homogênea quanto ao grau de sangue. Um grupo (n= 16) foi tratado com suspensão de nanopartículas de cloxacilina, outro (n=13) recebeu formulação de cloxacilina em veículo oleoso e o controle (n=17) não foi tratado. Os bovinos receberam 1 ml das formulações, na forma de colírio oftálmico, em duas aplicações, com intervalo de 4 dias entre elas. Os animais passaram por avaliações clínicas e por exames microbiológicos oculares. Após a primeira e a segunda aplicação, dia 6 e 9 respectivamente, foi observada uma redução acentuada dos sinais clínicos no grupo que recebeu a formulação nanoestruturada em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos com relação ao isolamento do agente ($p = 0,85$), no dia 6. Após o segundo tratamento, dia 9, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com a formulação nanoestruturada e a formulação oleosa, com relação ao isolamento do agente ($p = 0,07$), mas houve diferença entre o grupo tratado com a formulação nanoestruturada e o controle ($p = 0,012$). Os resultados indicam que a formulação nanoestruturada se mostrou mais eficaz na redução dos sinais clínicos e da carga bacteriana quando comparada aos demais grupos.

Palavras-chave: Nanopartículas mucoadesivas. *Pinkeye*. Tratamento tópico.

GENERAL ABSTRACT

The infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) is an important ocular disease of cattle. One of the great challenges of IBK is its treatment, given that both topical and parenteral formulations present several drawbacks. The application of parenteral drugs has a longer grace period and may leave residues in milk and meat. The topical application is often precluded by handling difficulty, since many applications are required. In order to circumvent treatment limitations, we evaluated the use of a nanostructured formulation of cloxacillin. The IBK was experimentally induced in 46 calves, both pure and crossbred, homogeneously divided into 3 groups according to blood degree. One group (n = 16) was treated with a suspension of cloxacillin nanoparticles, and another (n = 13) received an oil based cloxacillin formulation and the control (n = 17) was not treated. The animals received 1 ml of the formulations, in the form of eye drops, in two applications with interval of 4 days between each. The animals underwent clinical evaluations and ocular microbiological exams. After the first and second applications, day 6 and 9 respectively, we observed a pronounced reduction of the clinical signs in the group receiving the nanostructured formulation when compared to the remaining groups ($p < 0.05$). There was no significant difference between the groups regarding the isolation of the agent ($p = 0.85$) on day 6. After the second treatment, day 9, there was no significant difference between the groups treated with the nanostructured formulation and the oil based formulation, regarding the isolation of the agent ($p = 0.07$), but there was difference between the group treated with the nanostructured formulation and the control ($p = 0.012$). The results indicate that the nanostructured formulation was more effective in reducing clinical signs and bacterial load when compared to the remaining groups.

Keywords: Mucoadhesive nanoparticles. Pinkeye. Topical treatment.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Epidemiologia	11
2.2	Etiologia	13
2.3	Fisiopatogenia	14
2.4	Sinais Clínicos	17
2.5	Diagnóstico	19
2.6	Tratamento	20
2.6.1	Aplicação subconjuntival	22
2.6.2	Aplicação tópica	23
2.6.3	Aplicação intramuscular e subcutânea	24
2.7	O uso da nanotecnologia na saúde animal	25
2.7.1	Nanopartículas poliméricas mucoadesivas	27
2.7.2	Cloxacilina nanoestruturada para o tratamento da CIB	28
3	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	45
	ARTIGO 1 Potencial clínico de nanopartículas mucoadesivas de cloxacilina no tratamento da ceratoconjuntivite infecciosa bovina .	45
1	INTRODUÇÃO	47
2	MATERIAIS E MÉTODOS	49
2.1	Animais	49
2.2	Amostra utilizada no desafio e infecção experimental	50
2.3	Formulações farmacêuticas e tratamento dos animais	51
2.4	Exames oculares: clínico e microbiológico	52
2.5	Análise estatística	53
3	RESULTADOS	55
4	DISCUSSÃO	64
5	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICE	74

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina (CIB), também conhecida por “*pinkeye*”, “doença do olho branco”, “mal do olho” entre outras denominações, é uma das doenças oculares mais importantes dos bovinos, responsável por perdas econômicas e produtivas em rebanhos de todo o mundo (POSTMA; CARFAGNINI; MINATEL, 2008). É uma doença contagiosa causada por uma bactéria Gram negativo denominada *Moraxella bovis*. Os animais acometidos apresentam manifestações clínicas que iniciam com lacrimejamento, fotofobia, edema e opacidade de córnea, podendo evoluir para úlcera de córnea e, em alguns casos, cegueira irreversível (BAPTISTA, 1979).

Para o tratamento dessa enfermidade, as drogas injetáveis muitas vezes apresentam períodos de carência elevados, com risco de deixar resíduos no leite e na carne (ALEXANDER, 2010). Como alternativa para o tratamento parenteral (*i.e.* intramuscular, intrapalpebral e outras) das infecções oculares tem-se a via ocular tópica, que é menos invasiva e culmina em baixas concentrações sistêmicas de princípio ativo. Por outro lado, o tratamento tópico é frequentemente impossibilitado pela dificuldade de manejo, já que são necessárias várias aplicações para que se atinja uma concentração de antimicrobianos suficiente e constante na conjuntiva ocular para a cura microbiológica (MCCONNEL; SHUM; HOUSE, 2007).

Muitos antimicrobianos são utilizados para o tratamento da CIB, dentre os quais a cloxacilina, que apresenta potente atividade antimicrobiana contra *M. bovis* (DAIGNEAULT; GEORGE; BAGGOT, 1990; GEORGE; KEEFE; DAIGNEAULT, 1989; MCCONNEL; SHUM; HOUSE, 2007; O’CONNOR et

al., 2007). Todavia este fármaco apresenta-se comercialmente em formulações farmacêuticas com limitações como as já citadas anteriormente.

Uma alternativa para contornar estas limitações seria a utilização de cloxacilina encapsulada em nanopartículas poliméricas mucoadesivas, uma formulação de caráter inovador no tratamento de afecções oculares em bovinos (GERN et al., 2013). Nanopartículas mucoadesivas têm a capacidade de se aderir à mucosa ocular, minimizando a necessidade de múltiplos tratamentos. Isso ocorre pela capacidade de liberação gradual e prolongada do fármaco. A utilização desses nanocarreadores pode promover, ainda, aumento adicional e constante do princípio ativo na superfície da córnea e no humor aquoso (SAHOO et al., 2010). Diante disso, o presente trabalho visa avaliar a eficácia da utilização de nanopartículas mucoadesivas de cloxacilina (MOSQUEIRA; ARAUJO; BRANDAO, 2011) para o tratamento da ceratoconjuntivite infecciosa bovina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia

A Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina é uma enfermidade cosmopolita, sendo uma das doenças que mais causa prejuízo econômico em rebanhos bovinos leiteiros do MERCOSUL (BAPTISTA, 1979; CONCEIÇÃO; TURNES, 2003; WILCOX, 1970b). A CIB foi diagnosticada na maioria dos estados brasileiros, e em países como Uruguai, Argentina, Paraguai e Chile, afetando principalmente animais de raças europeias (CONCEIÇÃO; TURNES, 2003). Segundo Baptista e Ribeiro (1974), a região sul e a de fronteira do Rio Grande do Sul são as mais atingidas pela doença. Na Austrália, estimou-se que a doença produziu perdas superiores a 22 milhões de dólares em 1979 (SLATTER et al., 1982), e nos Estados Unidos, em 1993, de 150 milhões de dólares (KIRKPATRICK; LALMAR, 2015). São escassos os estudos recentes sobre o impacto econômico da CIB.

Apesar de não ser uma doença fatal, ocasiona significativas perdas econômicas e produtivas devido à queda da produção de leite, descarte de leite ocasionado por tratamento antimicrobiano, despesas com medicamentos, dificuldade de manejo, assistência veterinária não planejada e, eventualmente, perda de visão e descarte prematuro de animais. Outro fator a se considerar é a evidente perda de peso ao desmame que pode variar de 6,8 a 13,6kg (BROWN et al., 1998; FUNK et al., 2009; THRIFT; OVERFIELD, 1974). Funk et al. (2014) observaram, ainda, menor deposição de gordura na altura da 12^a costela, menor área de olho de lombo e peso corporal inferior em bovinos de corte ao desmame, com evidência de CIB.

A doença acomete animais de todas as idades, independentemente do sexo e raça, mas nas regiões onde é endêmica, as taxas de incidência são maiores

nos animais jovens, de dois a doze meses de idade. Alguns autores relatam que os zebuínos e suas cruzas são menos frequentemente afetados (FRISCH, 1975; WEBBER; SELBY, 1981). Vale ressaltar que o efeito da raça com relação à incidência da CIB é, em alguns casos, empírico. Outros fatores como, por exemplo, o sistema de produção intensivo, adotado preferencialmente para determinadas raças, pode propiciar maior incidência da CIB. Nesse caso, o contato entre os animais facilita a transmissão da doença entre os animais.

A CIB pode apresentar curso agudo, subagudo ou crônico, atingindo apenas um ou ambos os olhos (PUNCH et al., 1985). É uma doença altamente contagiosa, transmitida por contato direto, aerossóis e fomites contaminados com a secreção nasal ou ocular de bovinos infectados (CONCEIÇÃO; TURNES, 2003). A CIB também pode ser transmitida por vetores mecânicos, as moscas, sendo que a *Moraxella bovis* pode sobreviver por mais de três dias nas patas desses insetos (GERHARDT et al., 1982). Bovinos que se recuperaram dessa afecção e animais não clinicamente acometidos podem atuar como reservatórios do agente no rebanho. A CIB ocorre principalmente nas estações quentes do ano, quando a população de vetores, *Musca autumnalis* e *Musca domestica*, e o foto-período aumentam (CONCEIÇÃO; TURNES, 2003; SMITH, 2006). Além disso, as forrageiras de maior porte, a presença de ervas daninhas, poeira e maior tempo de incidência solar, típicos do verão, podem causar irritação mecânica dos olhos aumentando a predisposição a infecções (BROWN; ADKINS, 1972). O aumento da exposição dos animais à radiação ultravioleta facilita a infecção por *M. bovis* e agrava a doença (HUGHES; PUGH; MCDONALD, 1965; NAYAR; SAUNDERS, 1975). O estado nutricional dos animais também é um fator importante (WEBBER; SELBY, 1981). Um dos primeiros sinais da deficiência de vitamina A é a redução da sensibilidade ocular e cegueira noturna (BARNET; PALMER; ABRAMS, 1975),

que podem facilitar a ocorrência de trauma e infecções (WEBBER; SELBY, 1981).

2.2 Etiologia

A *Moraxella bovis* é tradicionalmente considerada o agente causal primário da CIB (GOULD et al., 2013). Juntamente com *M. bovis*, outras bactérias Gram negativo foram identificadas no fluido ocular de bovinos normais e afetados pela CIB. Estas bactérias receberam várias designações como diplococos hemolíticos (PUGH; HUGHES, 1966), *Neisseria* hemolítica (FAIRLIE, 1966), *Neisseria* spp. (BARBER, 1984; BARBER; JONES; WOOD, 1986; SPRADBROW et al., 1967), *Neisseria (Branhamella) catarrhalis* (WILCOX, 1970a) ou *Moraxella ovis* (CERNY et al., 2006; ELAD; YERUHAM; BERNSTEIN, 1988).

Angelos et al. (2007) relataram o isolamento de uma nova espécie do gênero *Moraxella* isolada de animais com evidência de CIB, denominada *Moraxella bovoculi* sp. nov. Essa descoberta desencadeou novas possibilidades para que se pudesse entender melhor a epidemiologia da doença como uma afecção potencialmente multicausal. No entanto, a *M. bovoculi* sozinha não foi capaz de induzir a doença experimentalmente. Acredita-se que ela atue como um agente secundário no desenvolvimento da patologia em questão (GOULD et al., 2013).

A *Moraxella bovis* pertence à família *Moraxellaceae*. Estudos de hibridização de DNA e análise da sequência do rDNA foram realizados e os gêneros, *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Psychrobacter* foram removidos da família *Neisseriaceae* e incluídos na família *Moraxellaceae* (ROSSAU, 1991). A *M. bovis* é uma bactéria Gram negativo, imóvel, aeróbica, produtora de oxidase, variável para produção de catalase e colagenase, não esporula, não fermenta

carboidratos nem reduz nitratos. A espécie apresenta um pleomorfismo característico, apresentando-se aos pares ou em cadeias curtas, variando de cocos, a cocobacilos e bacilos. Em ágar sangue, formam colônias lisas ou rugosas, com 1 a 3 mm de diâmetro, circulares, levemente esbranquiçadas e com um estreito halo de β -hemólise (PUGH; HUGHES, 1966).

Bactérias isoladas de casos clínicos de CIB formam colônias rugosas que se coradas pelo cristal violeta, auto-aglutinam em água destilada e aglutinam hemácias de várias espécies, características associadas à presença de fímbrias. As colônias rugosas (fimbriadas), ao serem removidas do ágar, deixam pequenas concavidades no meio de cultivo, fenômeno conhecido por corrosão do ágar. Além disso, a bactéria também apresenta uma forma de translocação superficial conhecida como *twitching motility* (BROWN et al., 1998).

2.3 Fisiopatogenia

A *Moraxella bovis* apresenta vários fatores de virulência, mas apenas dois são determinantes para causar doença clínica: a presença de fímbrias (pili de tipo IV) na superfície da célula bacteriana (CHANDLER; BAPTISTA; TURFREY, 1979; PEDERSEN; FROHOLM; BOVRE, 1972; POSTMA; CARFAGNINI; MINATEL, 2008; PUGH JUNIOR; HUGES, 1971) e a secreção de uma citotoxina β -hemolítica, corneotóxica e leucotóxica (BEARD; MOORE, 1994; KAGONYERA; GEORGE; MUNN, 1989; ROGERS; CHEVILLE; PUGH, 1987). Outros fatores de virulência em potencial incluem fosfolipases (FARN et al., 2001), sistemas de aquisição de ferro (FENWICK et al., 1996; POSTMA; CARFAGNINI; MINATEL, 2008; YU; SCHRYVERS, 2002), além de enzimas proteolíticas, hidrolíticas (FRANK; GERBER, 1981) e endotoxinas (CONCEIÇÃO; TURNES, 2003; JOHANSEN; WANNEMUEHLER; ROSENBUSCH, 1990).

As fímbrias da *Moraxella bovis* participam do processo de aderência bacteriana à mucosa ocular, prevenindo a remoção dos organismos pelo fluxo contínuo de secreção ocular e pelo ato de piscar (CHANDLER; BAPTISTA; TURFREY, 1979; CHANDLER; SMITH; TURFREY, 1981; PEDERSEN; FROHOLM; BOVRE, 1972; PUGH JUNIOR; HUGES, 1971; RUEHL et al., 1988; WILCOX, 1970b). Somente as cepas que apresentam fímbrias são capazes de estabelecer a infecção ocular e desencadear os sinais clínicos de CIB experimentalmente (CHANDLER; BAPTISTA; TURFREY, 1979; PEDERSEN; FROHOLM; BOVRE, 1972; PUGH JUNIOR; HUGES, 1971).

Foram identificados dois tipos de pili funcionalmente distintos denominados Q e I (anteriormente denominados β e α) (MARRS; RUEHL; FALKOW, 1988). O pili Q aumenta a capacidade de fixação das bactérias à córnea bovina. Já o pili I propicia a persistência do agente no local por mais tempo mantendo a infecção já estabelecida. Estudos têm demonstrado que as cepas de *M. bovis* que expressam pili tipo Q são mais eficientes em estabelecer a infecção e mais patogênicas que as cepas que expressam pili tipo I (RUEHL et al., 1988, 1993). Variações estruturais e antigênicas dentro e entre espécies ocorrem nos dois terços da região C terminal da subunidade fimbrial. Estas fímbrias estão codificadas no cromossomo bacteriano e estima-se que pelo menos 22 genes estão envolvidos na biossíntese e regulação das fímbrias tipo IV de outras espécies bacterianas (KEIZER et al., 2001; MATTICK; WHITCHURCH; ALM, 1996).

Além da expressão de fímbrias, cepas patogênicas de *M. bovis* sintetizam uma β hemolisina, que tem uma importante função na patogênese. Cepas não hemolíticas são frequentemente isoladas de bovinos e geralmente não estão associadas à doença clínica (BROWN et al., 1998). Estudos indicam que a β hemolisina de *M. bovis* pertence à família RTX de exoproteínas bacterianas (BILLSON et al., 2000), caracterizada por produzir poros na membrana

citoplasmática das células alvo (epiteliais, leucócitos, hemácias), provocando efluxo de potássio, desequilíbrio osmótico e lise (ANGELOS; HESS; GEORGE, 2001).

Uma enzima secretada por *M. bovis* com atividade de fosfolipase B foi caracterizada por Farn et al. (2001). As fosfolipases, enzimas reconhecidas como o principal fator de virulência de alguns patógenos bacterianos, atuam hidrolisando os fosfolípidos de membranas biológicas, provocando lise celular, auxiliando na resistência à fagocitose (GOLDFINE et al., 1995; MCNAMARA; BRADLEY; SONGER, 1994). Marrion e Riley (2000) detectaram um fator solúvel produzido por *M. bovis* que provoca a separação de células de diferentes linhagens *in vitro*, incluindo células epiteliais da córnea. Esta exfoliatina pode participar na patogênese, facilitando a invasão da córnea.

Estudos *in vitro* sugerem que a *M. bovis* possui um eficiente sistema de aquisição de ferro constituído por sideróforos e receptores de membrana externa, que reconhecem lactoferrina e transferrina bovinas, duas proteínas capazes de quelar ferro presente nas secreções mucosas e no soro sanguíneo, respectivamente. A capacidade de a *M. bovis* multiplicar-se em meios com baixo conteúdo de ferro e de utilizar lactoferrina e transferrina bovina como fontes de ferro sugere um importante mecanismo de virulência (FENWICK et al., 1996; POSTMA; CARFAGNINI; MINATEL, 2008).

Enzimas hidrolíticas identificadas em culturas de *M. bovis*, tais como esterase C4, esterase-lipase C8, lipase C14, fosfoamidase, hialuronidase, fosfatase e enzimas proteolíticas, tais como a leucina e valina aminopeptidases e gelatinases, podem participar da produção das úlceras de córnea. Por outro lado, as cepas virulentas de *M. bovis* não têm a capacidade de hidrolizar o colágeno, principal componente da esclera, córnea e membrana basal (FRANK; GERBER, 1981).

Como outras bactérias Gram negativo, a *M. bovis* possui lipopolissacarídeo somático (LPS ou endotoxina) (CONCEIÇÃO; TURNES, 2003). O LPS estimula macrófagos, células endoteliais e linfócitos, que por sua vez, liberam uma série de citocinas (TNF, IL-1, IL-6). Essas citocinas induzem a adesão de neutrófilos e monócitos ao endotélio vascular, ativam e atraem células inflamatórias (quimiotaxia). A liberação de endotoxinas também induz outros eventos, como a ativação da via alternativa do sistema complemento e o recrutamento de neutrófilos e macrófagos ativados levando ao aumento do processo inflamatório no foco infeccioso. O grande influxo de neutrófilos é uma importante causa de injúria tecidual, uma vez que tecidos adjacentes normais também são destruídos pela resposta inflamatória (CULLOR; SMITH, 1996). Segundo Vogelweid et al. (1986), a resposta inflamatória do hospedeiro potencializa os danos à córnea em estágios mais avançados da doença, já que não foram encontradas bactérias na superfície do epitélio ulcerado ou danificado adjacente à área de lesão em bovinos inoculados experimentalmente.

2.4 Sinais Clínicos

Os primeiros sinais clínicos da CIB são lacrimejamento intenso, fotofobia e blefaroespasma. Neste estágio, as pálpebras tornam-se edemaciadas, havendo hiperemia da conjuntiva, evoluindo geralmente para blefarite. Entre um e quatro dias após o início da doença há formação de ceratite, o desenvolvimento de opacidade na superfície ocular (nébula), geralmente no centro da córnea. Uma ou várias úlceras pequenas (1 a 4 mm) podem ser observadas e também vesículas epiteliais (SMITH, 2006). As úlceras se formam após a adesão da *M. bovis* à camada externa da córnea e invasão do estroma (CHANDLER; TURFREY; SMITH, 1983; ROGERS; CHEVILLE; PUGH, 1987). Bactérias, leucócitos polimorfonucleares e as células da córnea liberam hidrolases e

proteases que provocam a modificação da disposição das fibras de colágeno e necrose das células (MOORE; RUTTER, 1989; PEDERSEN; FROHOLM; BOVRE, 1972).

A opacidade da córnea pode se tornar mais densa no ponto inicial e avançar centrifugamente sobre toda a área central da superfície ocular, fase denominada nubécula. As úlceras podem se tornar mais amplas e mais profundas durante alguns dias e podem ser observados sinais de uveíte anterior secundária à ceratite. Nessa fase o corrimento se torna mucopurulento (SMITH, 2006).

Aproximadamente quatro a sete dias após o início das ulcerações a vascularização circunlimbal começa a invadir a córnea. Por volta de nove a dez dias após o início dos sinais clínicos, uma rede de vasos sanguíneos cresce no estroma corneano em direção à úlcera, que se torna amarelada devido à necrose e infiltração de leucócitos no estroma corneano. Os vasos sanguíneos atingem gradativamente as bordas da úlcera estimulando a formação de tecido de granulação que preenche a área lesionada (CHANDLER; SMITH; TURFREY, 1981; SMITH, 2006).

Alguns animais se recuperam dos sinais clínicos, geralmente, de uma a três semanas, e se tornam portadores crônicos. Nesse caso, há redução do lacrimejamento e a opacidade discreta pode permanecer por um período de 1 a 2 meses. O retorno à transparência, normalmente, começa na região límbica. Após a cicatrização da córnea pode haver a formação de uma leve cicatriz. Em animais que apresentam sinais mais graves, pode ocorrer perda parcial ou total da visão, em alguns casos (SMITH, 2006). A aparência clínica, a persistência da infecção e a taxa de progressão da doença variam de animal para animal tanto a campo como em condições experimentais (HUGHES; PUGH, 1970).

2.5 Diagnóstico

As lesões características, que se originam da área central da córnea e progridem de forma centrífuga, facilitam o diagnóstico. O diagnóstico conclusivo é feito por isolamento e identificação da *Moraxella bovis*, uma vez que outros agentes podem induzir sinais clínicos semelhantes, tais como *Micoplama ssp.*, *Listeria monocytogenes* e o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) (SMITH, 2006).

O material de eleição para isolamento e identificação fenotípica e genotípica é o líquido conjuntival de animais em fase inicial da doença, coletado com *swabs* estéreis e cultivado em ágar sangue. Amostra de secreção lacrimal deverá ser colhida com *swab* dirigida à porção mais interna do olho (ANGELOS; BALL, 2007; GOULD et al., 2013).

As amostras devem ser coletadas e semeadas em placas de ágar sangue o mais rápido possível, preferencialmente no campo, e posteriormente, mantidas e incubadas a 35° C por 48-72 horas. Se não for possível, a amostra deverá ser colocada em água destilada estéril (1-2 ml) para prevenir dissecação e processadas dentro de 2 horas. Pode-se utilizar a refrigeração de amostras por, no máximo, 24 horas antes de serem semeadas. Pode-se também realizar a coleta com *swab* e adição de soro equino ou ainda com meio de Stuart por até 72 horas (GOMES, 2015).

Inicialmente a *M. bovoculi* poderia ser diferenciada de *M. bovis* e *M. ovis*, bem como de outros isolados da família *Moraxellae* pelo teste de fenilalanina deaminase (PADase), sendo a *M. bovoculi* PADase positiva. Mas quando comparados à caracterização molecular foram observadas *M. bovoculi* PADase negativa (ANGELOS; BALL, 2007). O diagnóstico definitivo, com a identificação da espécie de *Moraxella*, é determinado por testes moleculares.

Para diferenciar *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. ovis* foi desenvolvido um método utilizando PCR e enzimas de restrição. Com este método, o fragmento amplificado da região intergênica 16S-23S de *M. bovoculi* é cortado pela enzima *AfaI* resultando em duas bandas, enquanto que a de *M. bovis* e *M. ovis* não são cortadas e se mantêm como uma única banda no gel (ANGELOS; BALL, 2007). Libardoni et al. (2012) utilizaram a mesma técnica e obtiveram resultados semelhantes com enzima *RsaI*. Apesar de ser eficiente, essa técnica é cara, laboriosa e inviável em larga escala.

Shen et al. (2011) validaram um teste de PCR multiplex em tempo real comparando com a PCR multiplex convencional para *Moraxella* ssp. Dessa forma eles obtiveram alta especificidade (100%) e alta sensibilidade (96,5%) no teste. A PCR- multiplex em tempo real se mostra uma técnica rápida, de alta sensibilidade e especificidade, e factível em larga escala, contornando os inconvenientes das técnicas já citadas.

2.6 Tratamento

Transcorrido mais de um século do primeiro relato de CIB, as medidas preventivas e terapêuticas disponíveis ainda têm limitações (CONCEIÇÃO; TURNES, 2003). Diversos relatórios técnicos, publicações de empresas, artigos científicos e revisões descrevem a antibioticoterapia para CIB. Entretanto, o volume de informações avaliadas, o acesso limitado às publicações, as diferenças no delineamento dos estudos, definições da doença e resultados das pesquisas dificultam a tomada de decisão clínica por parte dos profissionais para tratamento dessa afecção (O'CONNOR et al., 2007). A decisão terapêutica é influenciada por inúmeros fatores, tais como a eficácia dos antimicrobianos, custo, exigência e disponibilidade de trabalho e qualidade das instalações e assistência veterinária (MCCONNELL; SHUM; HOUSE, 2007).

A eficácia da antibioticoterapia depende das propriedades farmacológicas da droga. Quanto maior for a sua lipossolubilidade, melhor será a distribuição pelos tecidos e fluídos corporais (PUNCH et al., 1985). O epitélio da córnea, relativamente lipofílico, tem uma baixa porosidade devido à alta tortuosidade das junções intercelulares. Essa é a principal barreira para drogas hidrofílicas, ao passo que a camada central do estroma, que é constituído principalmente por fibras de colágeno intercaladas e água, corresponde à maior parte da espessura da córnea, a qual é a principal barreira para fármacos lipofílicos (GRASS; ROBINSON, 1988; SCHOENWALD, 1990). Apesar dessas características, na maioria das vezes, as propriedades farmacocinéticas das drogas selecionadas são ignoradas no momento da escolha do antimicrobiano para tratamento (CONCEIÇÃO; TURNES, 2003).

A *M. bovis* é frequentemente suscetível à gentamicina, cefalosporinas de primeira geração, trimetroprima-sulfonamidas, nitrofuranos e tetraciclina quando aplicadas topicamente em suspensão, pomadas ou aerossóis (BROWN et al., 1998). Outros estudos relatam susceptibilidade antimicrobiana à ampicilina, cefalosporina, nitrofuranos, penicilina, sulfonamidas, tilmicosin, e sulfametoxazol-sulfonamida, e variável sensibilidade *in vitro* à cloxacilina, eritromicina, gentamicina, oxitetraciclina e estreptomicina (DAIGNEAUL; GEORGE, 1990; GEORGE, 1990; MCCONNEL; SHUM; HOUSE, 2007; SHRYOCK; WHITE; WERNER, 1998). Gern et al. (2013) avaliaram a susceptibilidade à cloxacilina convencional e nanoestruturada, *in vitro*, em diferentes isolados de *Moraxella*. As duas formulações se mostraram eficazes e todas as cepas testadas foram sensíveis à cloxacilina. Existem diferenças nos padrões de susceptibilidade entre cepas isoladas em regiões distintas, em um mesmo rebanho ao longo de um surto (TURNES; ALBUQUERQUE, 1984) ou de um mesmo animal (BROWN et al., 1998; SCHRAMM; ARAÚJO, 1994).

2.6.1 Aplicação subconjuntival

Administração subconjuntival de antimicrobianos tem como objetivo reduzir os custos do tratamento e o número de aplicações, uma vez que altas concentrações de antibiótico podem ser atingidas no filme lacrimal por essa via de aplicação (GEORGE, 1990; MCCONNEL; SHUM; HOUSE, 2007). Esse tipo de aplicação provavelmente permite que o fármaco se difunda diretamente através da esclera e coróide. Alternativamente, o fármaco pode extravasar do sítio de aplicação, atingir o filme lacrimal e a córnea semelhante ao que acontece na aplicação tópica (WARD; CLARK, 1991).

Embora as dosagens utilizadas por via subconjuntival sejam variáveis, o volume utilizado é de, no máximo, 1 ml. Acredita-se que por essa via seja possível manter a concentração terapêutica por 24 horas ou mais (WARD; CLARK, 1991). A concentração de antibióticos na lágrima foi mantida acima da concentração inibitória mínima (CIM) durante 24 horas em bovinos jovens que receberam uma injeção subconjuntival bulbar de uma formulação de oxitetraciclina convencional (100 mg / ml) (BUSWELL; HEWETT, 1983; GEORGE et al., 1990). A administração de uma única dose de oxitetraciclina de longa ação manteve a CIM por mais de 72 horas, ocasionando, por outro lado, uma grave necrose tecidual no local de aplicação (GEORGE et al., 1984). Devido a esse efeito, a utilização de formulações de longa ação é contra indicada por essa via (BROWN et al., 1998).

Outro fármaco muito utilizado por via subconjuntival é a penicilina G, o qual, no entanto, possui eficácia variável (ALEXANDER, 2010; MCCONNEL; SHUM; HOUSE, 2007). A aplicação subconjuntival de três doses de 300.000 UI de penicilina G procaínica com e sem 4 mg de dexametasona subconjuntival não se mostrou significativamente eficiente na redução dos sinais clínicos de CIB (ALLEN; GEORGE; WILLITS, 1995). Zielinski et al. (2002) utilizaram 300 mg

de tilmicosin subconjuntival, mas não encontraram diferença significativa na redução do grau de lesão e ganho de peso médio diário. A dificuldade de acesso, manejo e contenção dos animais muitas vezes inviabilizou a utilização dessa via de aplicação (ALEXANDER, 2010).

2.6.2 Aplicação tópica

A administração tópica de formulações antimicrobianas é muito utilizada para o tratamento da CIB pelo custo reduzido e por ser um método de fácil aplicação e não invasivo (GEORGE, 1990). No entanto, as suspensões antimicrobianas aquosas aplicadas topicamente têm meia vida curta na lágrima, nesse caso é necessário maior número de aplicações para que se atinja a CIM constante (MCCONNEL; SHUM; HOUSE, 2007).

Antibióticos *sprays* pulverizados no olho são irritantes e permanecem apenas alguns minutos antes da remoção pelas lágrimas. Apesar de a aplicação tópica de oxitetraciclina, aerossol ou em pó, ser potencialmente eficaz, são necessárias 3 a 4 aplicações por dia, por 4 a 7 dias (WARD; CLARK, 1991). Pomadas podem conseguir maior tempo de contato com o antimicrobiano, devido ao aumento da viscosidade e de liberação de pequenas gotículas das drogas que se instalam no saco lacrimal inferior após a aplicação (MCCONNEL; SHUM; HOUSE, 2007).

A aplicação tópica de uma suspensão de cloxacilina benzatínica em óleo, uma (BUSWELL; HEWETT, 1983) ou duas vezes, com 72 horas de intervalo (DEIGENEAULT; GEORGE, 1990), foi eficaz contra a infecção por *M. bovis*. Os bezerros naturalmente afetados com CIB, tratados com duas aplicações tópicas de cloxacilina benzatínica (250 mg, 72 horas de intervalo), tiveram uma redução similar nos tempos de regressão das lesões na córnea e isolamentos de *M. bovis*, quando comparados aos tratados com apenas uma

única dose (GEORGE; KEEFE; DAIGNEAULT, 1989). O tratamento nos estágios iniciais da doença, com úlceras de até 5 mm, é essencial para a eficácia terapêutica das formulações (GEORGE, 1990). Daigneault, George e Baggot (1990), trabalhando com a mesma formulação, não detectaram nenhuma atividade da cloxacilina no fluido lacrimal 36 horas após administração tópica e não foi detectada cloxacilina no soro, em qualquer momento após a administração tópica do fármaco.

2.6.3 Aplicação intramuscular e subcutânea

Fármacos administrados sistemicamente podem se difundir no olho através do filme lacrimal ou por meio da circulação perilimbal ou intra-ocular (MCCONNEL; SHUM; HOUSE, 2007). A administração parenteral de formulações de longa ação, como as tetraciclina (20 mg/kg, IM), mantém concentrações nas lágrimas próximas à CIM por mais de 24 horas (BROWN et al., 1998; PUNCH, 1985).

Edmondson, George e Farver (1989) e Roeder et al. (1995) utilizaram oxitetraciclina (20 mg/kg, IM) e obtiveram diferença significativa entre o grupo tratado e o controle no tratamento da CIB. Angelos et al. (2000) utilizaram florfenicol administrado por via subcutânea (SC) (1 dose – 40mg/kg) e intramuscular (IM) (2 doses/ intervalo de 48 horas, 20mg/kg) e observaram bons resultados no tratamento de bovinos jovens naturalmente acometidos pela CIB. Dueger et al. (1999) utilizaram florfenicol nas mesmas doses e vias de aplicação e observaram redução do tempo de cicatrização de úlcera de córnea, redução da severidade clínica e redução da carga bacteriana em bezerros infectados com *M. bovis*. Zielinski et al. (2002) utilizaram várias doses de tilmicosin (2,5; 5 e 10 mg/kg, SC), mas não encontraram diferença significativa na redução do grau de lesão e ganho de peso médio diário dos animais. Uma única dose de *Ceftiofur*

crystalline-free acid (CCFA) (6,6mg/kg) mostrou efeito positivo no tratamento da CIB em bovinos naturalmente infectados (DUERGER et al., 2004).

Um dos grandes problemas no tratamento da infecção ocular é a dificuldade de manejo para tratamento tópico, já que são necessárias várias aplicações para obtenção de uma concentração de antimicrobianos suficiente e constante para eliminação do agente. As drogas injetáveis podem deixar resíduos no leite e na carne, o que não é desejável do ponto de vista de produção principalmente na bovinocultura leiteira, já que o leite deve ser descartado (ALEXANDER, 2010).

2.7 O uso da nanotecnologia na saúde animal

Nanotecnologia (do latim *nanus* = muito pequeno, anão) é definida como a tecnologia dos materiais e estruturas onde o tamanho é mensurado em nanômetros, o que amplia o entendimento e controle da matéria por ação humana, possibilita o desenvolvimento de novas aplicações para os materiais. Isso ocorre porque em partículas muito pequenas as propriedades da matéria diferem consideravelmente em relação às grandes partículas (RAMÍREZ-MELLA; HERNÁNDEZ-MENDO, 2010). Essa tecnologia está emergindo rapidamente e permite que se trabalhe a nível molecular, átomo por átomo, criando e manipulando ferramentas, materiais e estruturas funcionais (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007; SCOTT, 2005).

Segundo Kumar (2010), o futuro da saúde animal passa pela nanotecnologia, a qual tem um grande potencial para beneficiar a agricultura e pecuária em todo o mundo. Há uma grande variedade de aplicações da nanotecnologia na saúde animal como exemplo, a liberação controlada de drogas, o desenvolvimento de sistemas de diagnóstico e tratamento de doenças, na alimentação e na reprodução animal (SCOTT, 2005).

De uma forma geral a nanotecnologia tem sido mais aplicada no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, para veicular fármacos com aplicação no tratamento do câncer, de doenças parasitárias, doenças infecciosas entre outras patologias (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

Para essa aplicação vários requisitos devem ser levados em consideração no desenvolvimento de nanopartículas como os carreadores de fármacos. Dentre tais requisitos podemos citar: o tamanho de partículas, as suas propriedades de superfície e a liberação das substâncias farmacologicamente ativas, a fim de se obter a ação do fármaco no local específico desejado, com um aprimoramento da terapêutica e da posologia e diminuição dos efeitos tóxicos (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

A vetorização de fármacos antimicrobianos para humanos e, mais recentemente, para uso animal é uma área promissora dentro da nanotecnologia. Uma das vantagens da vetorização de antimicrobianos em nanopartículas poliméricas é a possibilidade de aumentar a dose máxima tolerada e o índice terapêutico (PINTO-ALPHANDARY; ANDREMONT; COUVREUR, 2000; SCHIFFELERS; STORM; BAKKER-WOUDENBERG, 2001), devido à liberação e disposição modificadas do antimicrobiano quando encapsulado, bem como por uma modificação na sua biodistribuição (IRACHE et al., 2011). Além das vantagens das nanopartículas já citadas, estes sistemas apresentam outros benefícios, do ponto de vista tecnológico, dentre os quais se destacam: método de preparo simples, alto teor de encapsulamento de fármacos e viabilidade de encapsular substâncias tanto lipofílicas quanto hidrofílicas (PELTONEN et al., 2004).

A utilização de vetores nanoestruturados de fármacos, uma estratégia amplamente estudada para terapia humana, surge como uma possibilidade inovadora de tratamento para a CIB (GERN et al., 2013). A utilização de sistemas de liberação nanoestruturados de fármacos tem o potencial de manter o

índice terapêutico de diversos fármacos já disponíveis no mercado, aumentando sua eficácia, prevenindo a degradação ou inativação durante o trânsito até o sítio alvo, atingindo níveis plasmáticos constantes por um longo período e protegendo o organismo de reações adversas devido à distribuição inapropriada (BANKER; RHODES, 1996; CHANDASANA et al., 2014).

2.7.1 Nanopartículas poliméricas mucoadesivas

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos com diâmetro inferior a 1 μ m. Apesar das vantagens destes sistemas, estudos relatam que a maior dificuldade em se produzir tais vetores é a instabilidade em meio aquoso (CHACON et al., 1999), podendo ocorrer agregação e fusão das partículas após um longo período de estocagem (AUVILLAIN et al., 1989).

As nanopartículas poliméricas oferecem algumas vantagens específicas, tais como melhor estabilidade em fluidos biológicos e durante seu armazenamento, viabilizam liberação sustentada de fármacos e são aplicáveis à maioria das vias de administração (SOSNIK; NEVES; SARMENTO, 2014; VILA et al., 2002).

Para se produzir nanopartículas mucoadesivas é possível manipular as características superficiais do material particulado por meio do recobrimento com o polímero quitosana, uma alternativa que vem sendo estudada como forma de favorecer a retenção de nanopartículas em mucosas epiteliais e possivelmente aumentar a penetração de fármacos nesses locais (DE LA FUENTE et al., 2010; MAO; SUN; KISSEL, 2010; MENG; STURGIS; YOUAN, 2011). Visto que em pH fisiológico a quitosana apresenta cargas positivas, devido ao protonamento de seus grupos amino, podem ocorrer interações eletrostáticas entre as cargas positivas das partículas recobertas com quitosana e as cargas negativas comuns à

mucosa (CALVO; VILA-JATO; ALONSO, 1997), o que caracteriza um fenômeno de mucoadesividade.

Especificamente a mucoadesividade refere-se à bioadesividade de substâncias ou partículas ao muco ou às membranas mucosas. Para que a adesão ocorra, as moléculas de revestimento devem interagir com a interface, o que pode ocorrer por ligações iônicas, covalentes, de hidrogênio, ligações de Van-der-Waals e hidrofóbicas. No caso da quitosana com membranas mucosas, ocorre predominantemente a ligação iônica, por meio da atração eletrostática entre as cargas positivas do polímero e as cargas negativas da superfície de mucosas (SMART, 2005). Este fenômeno torna a quitosana um importante componente para a liberação de fármacos em mucosas (KEAN; THANOU, 2010; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; SAYIN et al., 2009; SOSNIK; NEVES; SARMENTO, 2014). Estudos relatam a baixa toxicidade desse polímero, particularmente via oral, um valor semelhante aos de sacarose e cloreto de sódio (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004).

O uso de nanocarreadores mucoadesivos é uma estratégia alternativa para contornar os inconvenientes do uso da via ocular tópica e via intramuscular, 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; SOSNIK; NEVES; SARMENTO, 2014).

2.7.2 Cloxacilina nanoestruturada para o tratamento da CIB

A cloxacilina é um antibiótico β -lactâmico usado clinicamente na terapêutica veterinária devido à sua atividade antibacteriana contra patógenos gram-positivos e gram-negativos. A vetorização da cloxacilina tem por objetivo a obtenção de uma nova forma farmacêutica de administração do antibiótico.

Esse tipo de formulação já foi testado para o tratamento da mastite bovina (CASTANHEIRAS, 2012) e para CIB, *in vitro* (GERN et al., 2013). Formulações de nanopartículas mucoadesivas são utilizadas a fim de manter concentrações elevadas do fármaco no local da infecção, menor absorção sistêmica, diminuição da dose e dos efeitos adversos, reduzindo também a presença de resíduo do antibiótico no leite, além do aumento da retenção do fármaco na mucosa (MOSQUEIRA; ARAUJO; BRANDÃO, 2011).

3 CONCLUSÃO

A CIB é uma doença que causa grande prejuízo à bovinocultura de corte e leite em todo o mundo. Um dos grandes desafios é o tratamento, já que as formulações convencionais apresentam diversos inconvenientes. A utilização de nanopartículas poliméricas mucoadesivas pode ser uma alternativa inovadora capaz de contornar as dificuldades na terapêutica dessa afecção.

REFERÊNCIAS

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 100, n. 1, p. 5-28, 2004.

ALEXANDER, D. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review of cases in clinical practice. **Veterinary Clinical Food Animals**, Philadelphia, v. 26, n. 3, p. 287-503, Nov. 2010.

ALLEN, L. J.; GEORGE, L. W.; WILLITS, N. H. Effect of penicillin or penicillin and dexamethasone in cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 206, n. 8, p. 1200-1203, Apr. 1995.

ANGELOS, J. A.; BALL, L. M. Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other moraxella by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 19, n. 15, p. 532-534, Sept. 2007.

ANGELOS, J. A. et al. Efficacy of florfenicol for treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 216, n. 1, p. 62-64, Jan. 2000.

ANGELOS, J. A. et al. *Moraxella bovoculi* sp. nov., isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. **International Journal of System Evolution Microbiology**, London, v. 57, n. 4, p. 789-795, Apr. 2007.

ANGELOS, J. A.; HESS, J. F.; GEORGE, L. W. Cloning and characterization of a *Moraxella bovis* cytotoxin gene. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 62, n. 8, p. 1222-1228, 2001.

AUVILLAN, M. et al. Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroniques. **S. T. P. Pharma Sciences**, Paris, v. 5, p. 738-744, 1989.

BANKER, G. S.; RHODES, C. T. **Modern pharmaceuticals**. 3rd ed. New York: M. Dekker, 1996. 943 p.

BAPTISTA, P. J. H. P. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. **British Veterinary Journal**, London, v. 135, p. 225-242, 1979.

BAPTISTA, P. J. H. P.; RIBEIRO, L. A. O. Querato-conjuntivite infecciosa dos bovinos no Rio Grande do Sul. **Atualidades Veterinárias**, Belo Horizonte, v. 3, p. 10-15, 1974.

BARBER, D. M. Bacterial population of the eyes of slaughter cattle. **The Veterinary Record**, London, v. 115, n. 8, p. 169, 1984.

BARBER, D. M.; JONES, G. E.; WOOD, A. Microbial flora of the eyes of cattle. **The Veterinary Record**, London, v. 118, n. 8, p. 204-206, 1986.

BARNET, K. C.; PALMER, A. C.; ABRAMS, J. T. Ocular changes associated with hipovitaminosis A in cattle. **British Veterinary Journal**, London, v. 39, p. 22-31, 1975.

BEARD, M. K.; MOORE, L. J. Reproduction of bovine Keratoconjunctivitis with a purified haemolytic and cytotoxic fraction of *Moraxella bovis*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 15-33, Sept. 1994.

BILLSON, F. M. et al. Characterization of hemolysin of *Moraxella bovis* using a hemolysis-neutralizing monoclonal antibody. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 6, p. 3469-3474, 2000.

BROWN, J. F.; ADKINS, T. R. Relationship of feeding activity of face flies (*Musca autumnalis*) in calves. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 33, p. 2551-2555, 1972.

BROWN, M. H. et al. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 12, n. 4, p. 259-266, July 1998.

BUSWELL, J. F.; HEWETT, G. R. Single topical treatment for bovine keratoconjunctivitis using benzathine cloxacillin. **The Veterinary Record**, London, v. 113, n. 26, p. 621-622, 1983.

BUZEA, C.; PACHECO, B. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases**, Melville, v. 2, n. 4, p. 1-103, 2007.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. **The International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 153, n. 1, p. 41-50, July 1997.

CASTANHEIRAS, R. G. **Nanopartículas bioadesivas para administração intramamária**: desenvolvimento, caracterização físicoquímica, cinética de liberação e avaliação biológica *ex vivo*. 2012. 132 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.

CERNY, H. E. et al. Effects of *Moraxella (Branhamella) ovis* culture filtrates on bovine erythrocytes, peripheral mononuclear cells, and corneal epithelial cells. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 3, p. 772-776, 2006.

CHACON, M. et al. Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Berlin, v. 8, n. 2, p. 99-107, 1999.

CHANDASANA, H. et al. Corneal targeted nanoparticles for sustained natamycin delivery and their PK/PD indices: an approach to reduce dose and dosing frequency. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 477, n. 1/2, p. 317-325, Dec. 2014.

CHANDLER, R. L.; BAPTISTA, P. J. H. P.; TURFREY, B. Studies on the pathogenicity of *Moraxella bovis* in relation to infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 89, p. 441-448, 1979.

CHANDLER, R. L.; SMITH, M. D.; TURFREY, B. A. Ultrastructural and histological studies on the corneal lesion in infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 91, n. 2, p. 175-184, 1981.

CHANDLER, R. L.; TURFREY, B. A.; SMITH, K. Laboratory model for Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: the pathogenicity of different strains of *Moraxella bovis*, pathology and ultrastructural observations. **Research in Veterinary Science**, London, v. 35, p. 277-284, 1983.

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

CULLOR, S. J.; SMITH, W. L. Endotoxin and disease in food animals. **Compendium Continuing Education Veterinarian Practitioner**, Ithaca, v. 18, n. 1, p. 31-37, 1996.

DAIGNEAULT, J.; GEORGE, L. W. Topically applied benzathine cloxacillin for treatment of experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 51, n. 3, p. 376-380, 1990.

DAIGNEAULT, J.; GEORGE, L. W.; BAGGOT, J. D. Ocular and serum disposition kinetics of cloxacillin after topical administration of benzathine cloxacillin and intravenous administration of sodium cloxacillin to calves. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 51, n. 3, p. 381-385, 1990.

DE LA FUENTE, M. et al. Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, London, v. 62, n. 1, p. 100-117, Jan. 2010.

DUEGER, E. L. et al. Efficacy of a longacting formulation of ceftiofur crystalline-free acid for the treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 65, n. 9, p. 1185-1188, Sept. 2004.

DUEGER, E. L. et al. Efficacy of florfenicol in the treatment of experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 60, n. 8, p. 960-964, 1999.

EDMONDSON, A. J.; GEORGE, L. W.; FARVER, T. B. Survival analysis for evaluation of corneal ulcer healing times in calves with naturally acquired infectious bovine keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 50, n. 6, p. 838-844, 1989.

ELAD, D.; YERUHAM, I.; BERNSTEIN, M. *Moraxella ovis* in cases of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in Israel. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe**, Berlin, v. 35, n. 6, p. 431-434, 1988.

FAIRLIE, G. The isolation of a haemolytic Neisseria from cattle and sheep in the North of Scotland. **The Veterinary Record**, London, v. 78, p. 649-650, 1966.

FARN, J. L. et al. Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 22, p. 6717-6720, 2001.

FENWICK, B. et al. Iron repressible outer membrane proteins of *Moraxella bovis* and demonstration of siderophore-like activity. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 48, n. 1/2, p. 315-324, Feb. 1996.

FRANK, S. K.; GERBER, J. D. Hydrolytic enzymes of *Moraxella bovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 13, n. 2, p. 269-271, 1981.

FRISCH, J. E. The relative incidence and effect of bovine infectious keratoconjunctivitis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Animal Production**, Edinburgh, v. 21, p. 265-274, 1975.

FUNK, L. et al. A randomized and blinded field trial to assess the efficacy of an autogenous vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in beef calves. **Vaccine**, Kidlington, v. 27, n. 34, p. 4585-4590, July 2009.

FUNK, L. D. et al. Associations between infectious bovine keratoconjunctivitis at weaning and ultrasonographically measured body composition traits in yearling cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 244, n. 1, p. 100-106, 2014.

GEORGE, L. W. Antibiotic treatment of infectious bovine keratoconjunctivitis. **The Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 80, n. 3, p. 229-235, July 1990.

GEORGE, L. W. et al. Antibiotic treatment of *Moraxella bovis* infection in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 185, n. 10, p. 1206-1209, 1984.

GEORGE, L. W.; KEEFE, T.; DAIGNEAULT, J. Effectiveness of two benzathine cloxacillin formulations for treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 50, p. 1170-1174, 1989.

GERHARDT, R. R. et al. The role of face flies in an episode of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 180, p. 156-159, 1982.

GERN, J. et al. Avaliação *in vitro* de cloxacilina nanoencapsulada contra diferentes isolados de moraxella. In: WORKSHOP DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, 7., 2013, São Carlos. **Anais...** São Carlos: EMBRAPA Instrumentação, 2013. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-leite/saude/artigos/avaliacao-vitro-cloxacilina-nanoencapsulada-t1939/165-p0.htm>>. Acesso em: 2 mar. 2015.

GOLDFINE, H. et al. Membrane permeabilization by *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C is independent of phospholipid hydrolysis and cooperative with listeriolysin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, n. 7, p. 2979-2983, Mar. 1995.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Moraxella* ssp.:** microbiologia clínica veterinária. Porto Alegre: UFRGS, 2015. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Moraxella%204-2015.pdf>>. Acesso em: 9 mar. 2015.

GOULD, A. S. et al. A Randomized blinded challenge study to assess association between *Moraxella bovoculi* and Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in dairy calves. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 164, n. 1/2, p. 108-115, May 2013.

GRASS, G. M.; ROBINSON, J. R. Mechanism of corneal penetration in vivo and in vitro kinetics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 77, p. 3-14, 1988.

HUGHES, D. E.; PUGH, G. W. A five-year study of infectious bovine keratoconjunctivitis in a beef herd. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 157, p. 443-451, 1970.

HUGHES, D. E.; PUGH, G. W.; MCDONALD, T. J. Ultraviolet radiation and *Moraxella bovis* in the etiology of bovine infectious keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 26, p. 1331-1338, 1965.

IRACHE, J. M. et al. Nanomedicine: novel approaches in human and veterinary therapeutics. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, n. 1/2, p. 1-25, 2011.

JOHANSEN, K. A.; WANNEMUEHLER, M. J.; ROSENBUSCH, R. F. Biological reactivity of *Moraxella bovis* lipopolysaccharide. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 51, n. 1, p. 46-51, 1990.

KAGONYERA, G. M.; GEORGE, L. W.; MUNN, R. Cytopathic effects of *Moraxella bovis* on cultured bovine neutrophils and corneal epithelial cells. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 50, p. 10-17, 1989.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, London, v. 62, n. 1, p. 3-11, 2010.

KEIZER, D. W. et al. Structure of a pilin monomer from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 26, p. 24186-24193, 2001.

KIRKPATRICK, J. G.; LALMAR, D. **Pinkeye in cattle infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK)**. Disponível em: <<http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2689/VTMD-9128web.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

KUMAR, S. Nanotechnology and animal health. **Veterinary World**, Wankaner, v. 3, n. 12, p. 567-569, 2010.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 1-18, Jan. 2010.

LIBARDONI, F. et al. *Moraxella bovoculi* em casos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 8, p. 743-746, 2012.

MAO, S.; SUN, W.; KISSEL, T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. **Advanced Drug Delivery Reviews**, London, v. 62, n. 31, p. 12-27, Jan. 2010.

MARRION, R. M.; RILEY, L. K. Detection of cell detachment activity induced by *Moraxella bovis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 9, n. 9, p. 1145-1149, Sept. 2000.

MARRS, C. F.; RUEHL, W. W.; FALKOW, S. Pilin gene phase variation of *Moraxella bovis* is caused by an inversion of pilin genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 7, p. 3032-3039, 1988.

MATTICK, J. S.; WHITCHURCH, C. B.; ALM, R. A. The molecular genetics of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*: a review. **Gene**, Amsterdam, v. 179, n. 1, p. 147-155, Nov. 1996.

MCCONNEL, C. S.; SHUM, L.; HOUSE, J. K. Infectious bovine keratoconjunctivitis antimicrobial therapy. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 85, n. 1/2, p. 65-69, Jan. 2007.

MCNAMARA, P. J.; BRADLEY, G. A.; SONGER, J. G. Targeted mutagenesis of the phospholipase D gene results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 12, n. 6, p. 921-930, June 1994.

MENG, J.; STURGIS, T. F.; YOUAN, B. C. Engineering tenofovir loaded chitosan nanoparticles to maximize microbicide mucoadhesion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Berlin, v. 44, n. 1/2, p. 57-67, Sept. 2011.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin, v. 5, n. 1, p. 561-573, June 2006.

MOORE, L. J.; RUTTER, J. M. Attachment of *Moraxella bovis* to calf corneal cells and inhibition by antiserum. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 66, n. 2, p. 39-42, 1989.

MOSQUEIRA, V. C. F.; ARAUJO, R. S.; BRANDÃO, H. M. **Nanoparticulate composition containing antibiotics composition containing antibiotics for intramammary administration in animals**. WIPO US n. WO/2011/150481, 8 Dec. 2011.

NAYAR, P. S. G.; SAUNDERS, J. R. Infectious bovine keratoconjunctivitis: 1., experimental production. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v. 39, p. 22-31, 1975.

O'CONNOR, A. M. et al. A review of randomized clinical trials reporting antibiotic treatment of infectious bovine keratoconjunctivitis in cattle. **Animal Health Research**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 119-127, 2007.

PEDERSEN, K. B.; FROHOLM, L. O.; BOVRE, K. Fimbriation and colony type of *Moraxella bovis* in relation to conjunctival Colonization and development to keratoconjunctivitis in cattle. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica Supplement**, Copenhagen, v. 80, n. 6, p. 911-918, 1972.

PELTONEN, L. et al. Improved entrapment efficiency of hydrophilic drug substance during nanoprecipitation of poly(l)lactide nanoparticles. **AAPS Pharmaceutical Scientists Technology**, Arlington, v. 5, n. 1, p. 115-120, 2004.

PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Bethesda, v. 13, n. 3, p. 155-168, Jan. 2000.

POSTMA, G. C.; CARFAGNINI, J. C.; MINATEL, L. *Moraxella bovis* pathogenicity: an update. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 31, n. 6, p. 449-458, Nov. 2008.

PUGH, G.; HUGHES, D. The isolation and characterization of *Moraxella bovis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 27, p. 957-962, 1966.

PUGH JUNIO, G. W.; HUGHES, D. E. Infectious bovine keratoconjunctivitis induced by different experimental methods. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 61, p. 23-45, 1971.

PUNCH, P. I. Plasma and tear concentrations of antibiotics administered parenterally to cattle. **Research in Veterinary Science**, London, v. 39, p. 179-187, 1985.

RAMÍREZ-MELA, M.; HERÁNDEZ-MENDO, O. Nanotechnology on animal production. **Tropical and Subtropical Agrosystems**, Yucatan, v. 12, n. 3, p. 423-429, Sept. 2010.

ROEDER, B. L. et al. Effect of early treatment with parenteral long-acting oxytetracycline on performance of beef calves with acute eye lesions. **Journal of Agricultural Practices**, New York, v. 16, n. 7, p. 6-11, July/Aug. 1995.

ROGERS, D. G.; CHEVILLE, N. F.; PUGH, G. W. Pathogenesis of corneal lesions caused by *Moraxella bovis* in gnotobiotic calves. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 24, p. 287-295, 1987.

ROSSAU, R. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genere *Moraxella*, *Acinetobacter* and *Psychrobacter* and related organisms. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 41, n. 2, p. 310-319, Apr. 1991.

RUEHL, W. W. et al. Purification, characterization, and pathogenicity of *Moraxella bovis* pili. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 168, n. 3, p. 983-1002, 1988.

RUEHL, W. W. et al. Q pili enhance the attachment of *Moraxella bovis* to bovine corneas in vitro. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 7, n. 2, p. 285-288, 1993.

SAHOO, S. et al. Mucoadhesive nanopolymer: a novel drug carrier for topical ocular drug delivery. **European Journal of Scientific Research**, Victoria, v. 46, n. 3, p. 401-409, 2010.

SAYIN, B. et al. TMC-MCC (N-trimethyl chitosan-mono-N-carboxymethyl chitosan) nanocomplexes for mucosal delivery of vaccines. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Berlin, v. 38, n. 4, p. 362-369, Nov. 2009.

- SCHIFFELERS, R.; STORM, G.; BAKKER-WOUDENBERG, I.
Liposomeencapsulated aminoglycosides in pre-clinical and clinical studies.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy, London, v. 48, n. 3, p. 333-344,
2001.
- SCHOENWALD, R. D. Ocular drug delivery: pharmacokinetic considerations.
Clinical Pharmacokinetics, Auckland, v. 18, n. 4, p. 255-269, Apr. 1990.
- SCHRAMM, R. C.; ARAÚJO, F. L. Diferenças antigênicas de clones de
Moraxella bovis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1,
p. 75-78, jun. 1994.
- SCOTT, N. R. Nanotechnology and animal health. **Revue Scientifique et
Technique de L'Office International des Epizooties**, Paris, v. 24, n. 1, p. 425-
432, 2005.
- SHEN, H. G. et al. Development and evaluation of a multiplex real-time PCR
assay for the detection and differentiation of *Moraxella bovis*, *Moraxella*
bovoculi and *Moraxella ovis* in pure culture isolates and lacrimal swabs
collected from conventionally raised cattle. **Journal of Applied Microbiology**,
Oxford, v. 111, n. 5, p. 1037-1043, Nov. 2011.
- SHRYOCK, T. R.; WHITE, D. W.; WERNER, C. S. Antimicrobial
susceptibility of *Moraxella bovis*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 61,
n. 4, p. 305-309, 1998.
- SLATTER, D. H. et al. A national survey of the occurrence of infectious bovine
keratoconjunctivitis. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 59, n. 3, p.
65-72, 1982.
- SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion.
Advanced Drug Delivery Reviews, London, v. 57, n. 11, p. 1556-1568, 2005.
- SMITH, B. P. **Medicina interna de grandes animais**. 3. ed. Barueri: Manole,
2006. 1728 p.

SOSNIK, A.; NEVES, J.; SARMENTO, B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: a review. **Progress in Polymer Science**, Emlsford, v. 39, n. 12, p. 2030-2075, Dec. 2014.

SPRADBROW, P. B. A microbiological study of bovine conjunctivitis and keratoconjunctivitis. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 43, n. 2, p. 55-58, 1967.

THRIFT, F. A.; OVERFIELD, J. R. Impact of pinkeye (infectious bovine kerato-conjunctivitis) on weaning and postweaning performance of Hereford calves. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 38, p. 1179-1184, 1974.

TURNES, C. G.; ALBUQUERQUE, I. M. B. Serotypes and antibiotic sensitivity of *Moraxella bovis* isolated from an outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v. 46, p. 428-430, 1984.

VILA, A. et al. Design of biodegradable particles for protein delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 78, n. 1/3, p. 15-24, Jan. 2002.

VOGELWEID, C. M. et al. Scanning electron microscopy of bovine corneas irradiated with sun lamps and challenge exposed with *Moraxella bovis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 47, n. 2, p. 378-384, 1986.

WARD, D. A.; CLARK, S. E. Ocular pharmacology. **Veterinary Clinics of North America. Large Animal Practice**, Philadelphia, v. 7, n. 3, p. 779-791, 1991.

WEBBER, J.; SELBY, L. Risk factors related to the prevalence of infectious bovine keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 179, p. 823-826, 1981.

WILCOX, G. E. Bacterial flora of the bovine eye with special reference to the *Moraxella* and *Neisseria*. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 46, n. 6, p. 253-256, 1970a.

WILCOX, G. E. The etiology of infectious bovinekeratoconjunctivitis in Queensland: 1., *Moraxella bovis*. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 46, p. 409-414, 1970b.

YU, R. H.; SCHRYVERS, A. B. Bacterial lactoferrin receptors: insights from characterizing the *Moraxella bovis* receptors. **Biochemistry & Cell Biology**, Ottawa, v. 80, n. 1, p. 81-90, 2002.

ZIELINSKI, G. C. et al. Efficacy of different dosage levels and administration routes of tilmicosin in a natural outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye). **Veterinary Therapeutics**, Cambridge, v. 3, n. 2, p. 196-205, Dec. 2002.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO**ARTIGO 1 Potencial clínico de nanopartículas mucoadesivas de cloxacilina
no tratamento da ceratoconjuntivite infecciosa bovina**

Maia, J.M.S.^a, Silva, S.R.^b; Silva, M.R.; Sousa, R.V.^a; Souza, G.N.^c; Gern, J.C.^c,
Sales, E.B.^d, O'Connor, A. M.^e, Brandão, H.M.^{c,1} Guimarães, A.S.^{a,c,1,*}

^aDepartamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^bDepartamento de Farmácia, Pós graduação, Universidade Feral de Ouro Preto, CEP 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

^cEmbrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36038-330, Brasil

^dLaboratório de Biologia Molecular - LANAGRO/MG – CEP 33600-000, Pedro Leopoldo, MG

^eVeterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, IA 50010, USA

* Autor de correspondência, Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento 610, 36038-330, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. Tel.: +55 3233117533, fax: +55 3233117401. E.mail: alessandro.guimaraes@embrapa.br

¹ Esses autores contribuíram igualmente para o trabalho

Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).

RESUMO

A ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB) é uma importante afecção ocular que acomete bovinos em todo mundo. A utilização de drogas injetáveis no seu tratamento, muitas vezes, tem efeitos sistêmicos e pode deixar resíduos no leite e na carne. A aplicação pela via tópica ocular culmina em baixas concentrações sistêmicas de princípio ativo, por outro lado, é frequentemente impossibilitada pela dificuldade de manejo, já que são necessárias várias aplicações para que se atinja uma concentração de antimicrobianos suficiente e constante para eliminação do agente. Diante disso, o trabalho visa avaliar a eficácia de nanopartículas mucoadesivas de cloxacilina, uma formulação inovadora para o tratamento da CIB. A doença foi induzida experimentalmente em 46 animais, puros e mestiços, que foram divididos de forma homogênea em três grupos. Um grupo (n= 16) foi tratado com suspensão de nanopartículas de cloxacilina, outro (n=13) recebeu formulação de cloxacilina em veículo oleoso e o controle (n=17) não foi tratado. Os bovinos receberam 1 mL das formulações, na forma de colírio oftálmico, em duas aplicações, com intervalo de 4 dias entre elas. Os animais passaram por avaliações clínicas e por exames microbiológicos oculares. Observou-se uma redução mais acentuada dos sinais clínicos no grupo que recebeu a formulação nanoestruturada em relação aos demais grupos ($p < 0,05$) após a primeira e a segunda aplicação, dias 6 e 9 respectivamente. Em relação ao isolamento do agente, não houve diferença significativa na comparação entre os grupos tratados após o primeiro ($p = 0,85$) e o segundo tratamento ($p = 0,07$), mas houve diferença significativa entre o grupo tratado com a formulação nanoestruturada e o controle ($p = 0,012$). Os resultados indicam que a formulação nanoestruturada se mostrou mais eficaz na redução dos sinais clínicos e da carga bacteriana quando comparada aos demais grupos.

Palavras-chaves: *Pinkeye*. Nanopartículas mucoadesivas. Cloxacilina.

1 INTRODUÇÃO

A ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB), também conhecida por “*pinkeye*”, é uma afecção ocular importante dos bovinos e afeta rebanhos em todo o mundo (POSTMA; CARFAGNINI; MINATEL, 2008). É uma doença bacteriana altamente contagiosa, cuja etiologia primária é atribuída à *Moraxella bovis* (GOULD et al., 2013). Sua transmissão ocorre por contato direto, descarga nasal ou ocular, principalmente por vetores mecânicos (GERHARDT et al., 1982). A CIB acomete com maior frequência animais jovens, de dois a doze meses de idade podendo se estender para as demais faixas etárias do rebanho (BROWN et al., 1998). Essa afecção é responsável por perdas econômicas e produtivas (GOULD et al., 2013), que se devem à perda de peso (FUNK et al., 2009), queda da produção, descarte de leite ocasionado por tratamento, despesas com medicamentos, aumento de manejo e assistência veterinária (ALEXANDER, 2010; PRIETO et al., 2013). Eventualmente, pode ocorrer perda de visão e descarte prematuro de animais acometidos, quando não medicados de forma adequada (BROWN et al., 1998).

Para o tratamento, é preconizada a aplicação de antimicrobianos pela via tópica ou parenteral tal como intramuscular, subcutânea e intrapalpebral. As drogas injetáveis muitas vezes causam transtornos, pois têm efeito sistêmico e deixam resíduos no leite e na carne por mais tempo (ALEXANDER, 2010). Como alternativa para o tratamento parenteral tem-se o uso da via ocular tópica, por ser menos invasiva e não resultar em elevadas concentrações sistêmicas de princípio ativo. Por outro lado, o

tratamento tópico muitas vezes é impossibilitado pela dificuldade de manejo, já que são necessárias múltiplas aplicações para que se atinja uma concentração de antimicrobianos suficiente e constante para eliminação do agente (MCCONNEL; SHUM; HOUSE, 2007).

A fim de contornar os inconvenientes na posologia, tanto da terapia parenteral quanto tópica, o uso de nanocarreadores mucoadesivos tem se mostrado uma abordagem terapêutica promissora, já que pode promover a liberação sustentada de princípios ativos na mucosa ocular (SOSNIK; NEVES; SARMENTO, 2014; SULTANA et al., 2011). Esta estratégia pode manter as concentrações de fármacos na córnea por mais tempo e com isso reduzir o número de aplicações (CHANDASANA et al., 2014; LEONARDI et al., 2015).

A cloxacilina apresenta potente atividade antimicrobiana contra *M. bovis* (DAIGNEAULT; GEORGE, 1990; GEORGE; KEEFE; DAIGNEAULT, 1989; MCCONNEL; SHUM; HOUSE, 2007; O'CONNOR et al., 2007). Todavia este fármaco apresenta-se em formulações farmacêuticas convencionais com as já citadas limitações. Diante desse desafio, foram desenvolvidas nanopartículas catiônicas mucoadesivas capazes de promover a liberação sustentada de cloxacilina (MOSQUEIRA; ARAUJO; BRANDÃO, 2011). Nesse contexto, o presente trabalho visa avaliar a eficácia de nanopartículas mucoadesivas de cloxacilina no tratamento da CIB.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (CEUA-EGL), número de protocolo CEUA-EGL N°: 02/2012. O trabalho de campo foi realizado na Fazenda Experimental da Embrapa Gado de Leite, localizada no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil. No estudo foram utilizados 46 bovinos das raças holandês (*Bos taurus taurus*) e girolanda (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) com idade entre 4 a 12 meses. O número inicial de animais era de 55 animais, divididos em 3 grupos. Um grupo (n = 18) tratado com suspensão de cloxacilina nanoestruturada, outro (n = 17) com formulação de cloxacillin oleosa e o controle (n = 20), não tratado. Oito animais que não apresentaram isolamento do agente durante todo o experimento foram excluídos das análises. Um animal do grupo controle também foi excluído por ter sido submetido a tratamento com antimicrobiano sistêmico para tristeza parasitária bovina. Devido à exclusão desses animais o número de bezerros nos grupos experimentais foi alterado para 16, 13 e 17, no grupo tratado com a formulação nanoestruturada, no grupo tratado com a formulação oleosa e no controle, respectivamente. Os animais foram divididos em três grupos, randomizados, com distribuição homogênea quanto ao grau de sangue. Durante o experimento os bovinos receberam 500g de ração por dia, acesso à pastagem de *Cynodon dactylon* e água *ad libitum*.

Para assegurar que todos os animais se encontravam livres de infecção por *Moraxella* ssp., os bezerros passaram por avaliação clínica segundo Rosemberger e Stober (2008) e por dois exames microbiológicos (item 2.4), com intervalo de 15 dias. A coleta de amostras foi realizada segundo Gould et al. (2013). Após o trabalho experimental todos os animais foram submetidos a tratamento sistêmico (intramuscular) com tetraciclina de longa ação e local com cloxacilina nanoestruturada, com objetivo de eliminar o agente dos grupos experimentais.

2.2 Amostra utilizada no desafio e infecção experimental

As amostras utilizadas para infecção experimental foram produzidas a partir de amostras de *M. bovis* provenientes de um surto de ceratoconjuntivite em outro rebanho. O inóculo foi submetido a provas bioquímicas, tais como testes de Gram, catalase, oxidase e hidróxido de potássio a 3% (KOH) e também de crescimento em ágar MacConkey (BROWN et al., 1998).

A confirmação de *M. bovis* foi feita por PCR adaptada de Angelos e Ball (2007). Foram utilizados os iniciadores ISRup (5'-ACCGACGCTTATCGCAGGTCACTA-3') e ISRdown (5'-GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT-3') para amplificação da região intergênica 16S-23S, com fragmentos de 650pb para *M. bovis*. A reação da PCR foi realizada em um volume inicial de 20µL, contendo 5µL do tampão, 10µmols de cada iniciador, 200µM de cada deoxinucleotideo trifosfato(dNTP), 1U de DNA Polimerase GoTaq, 1µL de DNA molde (~50ng) e água ultrapura. A amplificação foi realizada utilizando-se uma

desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos de 35s a 94°C, 35s a 62°C, 35s a 72°C e uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Os produtos da amplificação foram verificados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5µg mL⁻¹) e, posteriormente, sequenciados utilizando-se o sequenciador automático Mega Bace 1000 (AMERSHAN BIOSCIENCES). As sequências obtidas foram avaliadas no programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). As amostras dos inóculos apresentaram 97% de similaridade com *M. bovis*.

A cepa utilizada na infecção experimental foi avaliada tanto para a cloxacilina convencional quanto nanoestruturada determinando-se a concentração inibitória mínima e, nesse caso, as duas formulações se mostraram efetivas *in vitro* (GERN et al., 2013).

O procedimento de indução experimental foi realizado no dia 0, segundo Gould et al. (2013). Os animais, devidamente contidos, receberam três gotas de anestésico local (Cloridrato de Lidocaína 2%) na superfície ocular. A córnea foi escarificada com auxílio do pincel de cerdas rígidas, realizando movimentos verticais e horizontais na região central, adaptado de Gould et al. (2013).

2.3 Formulações farmacêuticas e tratamento dos animais

Um grupo (n=16) recebeu a suspensão de nanopartículas mucoadesivas de cloxacilina (MOSQUEIRA; ARAUJO; BRANDÃO, 2011). Outro grupo (n=13) recebeu uma formulação de cloxacilina em veículo oleoso (*Miglyol*®) e o grupo controle (n=17) não recebeu nenhum tratamento.

Os animais receberam as formulações em duas aplicações, com intervalo de 96 horas entre elas, dia 2 e dia 6, de acordo com as características de liberação controlada das nanopartículas (MOSQUEIRA; ARAUJO; BRANDÃO, 2011). Em cada aplicação, no olho afetado, foi administrado 1mL da formulação (350 mg/olho), na forma de colírio oftálmico. A amostra de cloxacilina utilizada para a confecção das duas formulações foi obtida da mesma partida.

2.4 Exames oculares: clínico e microbiológico

Após a indução do quadro clínico, os animais foram examinados diariamente e o escore clínico classificado de 1 a 5. Os animais classificados com grau 1 não apresentaram sinais clínicos; grau 2, apresentaram lacrimejamento e hiperemia; grau 3, úlcera menor que 0,3 cm; grau 4, úlcera entre 0,3 e 0,6 cm e grau 5, úlcera maior que 0,6 cm (DAIGNEAULT; GEORGE, 1990). A classificação dos sinais clínicos foi realizada por três médicos veterinários. Antes do experimento, a doença foi induzida em 3 animais sadios com a finalidade de padronizar a classificação dos sinais clínicos pelos avaliadores.

Durante o experimento foram realizadas quatro coletas de material ocular para diagnóstico microbiológico. A primeira coleta foi realizada imediatamente antes da inoculação – dia 0. As demais coletas foram realizadas imediatamente antes que a primeira aplicação do antimicrobiano fosse realizada (dia 2), a outra antes da segunda aplicação (dia 6). A última coleta foi feita ao final do experimento, três dias após a segunda aplicação das formulações (dia 9).

O material coletado foi semeado em placas de ágar sangue ovino 5% e foi enviado ao laboratório de microbiologia e foi mantido na estufa por 24 a 36 horas a 37°C. As colônias foram submetidas à avaliação visual quanto à morfologia e presença de hemólise característica de *M. bovis*. Adicionalmente foram realizados testes de Gram, catalase, oxidase e hidróxido de potássio a 3% (KOH) e também de crescimento em ágar MacConkey (BROWN et al., 1998).

Os dias 6 e 9 foram utilizados para avaliar o efeito dos tratamentos tanto sobre a evolução clínica como microbiológica, sendo denominados de primeira e segunda avaliação, respectivamente.

2.5 Análise estatística

Modelos lineares de regressão logística explicativos foram realizados para os sinais clínicos e para as taxas de positividade dos exames microbiológicos. Essas análises foram realizadas utilizando-se o *software* EPI Info versão 3.5.3 (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011). As associações estatísticas foram avaliadas pelo teste qui-quadrado ou, quando necessário, pelo exato de Fisher. No caso de teste exato de Fisher, foi realizado pelo *software* In silico – Project support for the life sciences (IN SILICO, 2014). A medida da magnitude das associações foi determinada pela *odds ratio* (OR). Quando as tabelas de contingência possuíam zero em alguma casela, a correção de Haldane foi aplicada para estimar um valor aproximado de OR. Esta correção consiste em adicionar o valor 0,5 a cada frequência observada das caselas para tirar a indeterminação do valor zero no cálculo da OR.

A relação da gravidade das lesões e a proporção de animais de cada um dos dois grupos tratados em relação ao controle foram avaliadas antes do tratamento propriamente dito e após o primeiro e segundo tratamentos por meio do teste de tendência de Cochran-Armitage, utilizando-se para análise o software XLSTAT (2014). Este teste de tendência é utilizado em ocasiões de amostras pequenas, nas quais é preferível medidas exatas.

A possível associação do grau de sangue dos animais com os grupos tratados foi determinada por qui-quadrado, pelo *software* SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 2004), versão 9.1.3. O nível de significância considerado em todos os testes estatísticos deste estudo foi de $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

Não houve alteração dos parâmetros comportamentais e clínicos com a administração da formulação nanoestruturada na superfície ocular dos bovinos. A taxa de indução de sinais clínicos foi de 89,9% (49/55). Não houve influência dos diferentes graus de sangue dos animais com relação aos grupos tratados ($p>0,05$), confirmando que a seleção dos grupos foi homogênea.

Tabela 1 Regressão logística linear para permanência dos animais sintomas na primeira avaliação, e os valores obtidos pelo Teste Exato de Fisher, na segunda avaliação nos grupos que receberam a formulação nanoestruturada, a formulação oleosa e o controle

Grupo	Total	Primeira avaliação			Segunda avaliação	
		Positivos (%)	Odds Ratio (IC 95%)	p-valor	Positivos (%)	Odds Ratio*
Formulação nanoestruturada	16	2 (12,50) ^A	1,00	-	0 (0) ^A	1,00
Formulação oleosa	13	6 (46,15) ^B	6 (0,95-37,74)	0,002	3 (23,70) ^B	11,00
Controle	17	12 (70,58) ^C	18,8 (2,74-102,81)	0,010	15 (41,17) ^C	23,57
TOTAL	46	20 (43,47)		0,002	18 (39,13)	

As letras maiúsculas diferem entre si com $p<0,05$. SC – animais com sinais clínicos/ IC – intervalo de confiança.

*Valores de odds ratio aproximados, sem IC 95%, por serem construídos com correção de Haldane. Teste exato de Fisher ($p = 0,001$)

Com relação à redução dos sinais clínicos, houve diferença significativa entre os grupos tanto na primeira (dia 6) como na segunda (dia 9) avaliações ($p < 0,05$) (Tabela 1). Na primeira avaliação, a chance de os animais do grupo controle permanecerem com sinais clínicos foi 6 vezes maior e do grupo que recebeu a formulação oleosa foi de 18,8 vezes maior, quando comparados ao grupo tratado com a formulação nanoestruturada (Tabela 1). Na segunda avaliação, a chance de os animais do grupo controle permanecerem com sinais clínicos foi de 23,57 vezes maior e do grupo que recebeu a formulação oleosa foi de 11 vezes maior, quando comparados ao grupo tratado com a formulação nanoestruturada, no dia 9 (Tabela 1). Além disso, houve uma tendência linear crescente de permanência dos sinais clínicos no sentido grupo tratado com nanopartículas, grupo que recebeu a formulação oleosa e grupo controle, respectivamente, tanto na primeira avaliação como na segunda ($p < 0,05$).

Na primeira avaliação, foi observada redução dos sinais clínicos no grupo que recebeu a formulação nanoestruturada. Somente 2 (12,50%) dos bezerros que faziam parte desse grupo apresentaram sinais clínicos de CIB (Tabela 1) e foram observados apenas sinais leves como hiperemia e lacrimejamento (grau 2). No grupo que recebeu a formulação oleosa, 46,15% dos animais apresentavam sinais clínicos, no dia 6 (Tabela 1). Dos animais sintomáticos desse grupo 15,4% ($n=2$) apresentaram sinais clínicos moderados (grau 3), 30,7% ($n=5$) apresentaram sintomatologia leve (grau 2) e os demais, 53,9% se tornaram assintomáticos. No grupo controle, 70,58% dos bezerros apresentavam sinais clínicos (Tabela 1), sendo que 26,52% desses apresentavam úlceras (grau 3 e 4), também no dia 6.

Na segunda avaliação, dentre os animais tratados com a formulação nanoestruturada, nenhum apresentou sinais clínicos (Tabela1). No grupo tratado com a formulação oleosa havia ainda três animais sintomáticos (23,7%) sendo que um deles ainda apresentava uma pequena úlcera (grau 3). Alguns bezeros do grupo controle 41,17% (n=7) apresentavam sintomas compatíveis com a CIB (Tabela 1), sendo dois deles com úlceras entre 0,3 e 0,6 cm (grau 4), no dia 9.

A comparação da tendência de evolução da gravidade dos sinais entre indivíduos do grupo que recebeu a formulação nanoestruturada e controle apresentou os seguintes resultados: i) antes da primeira avaliação, houve uma tendência linear direta e significativa ($p = 0,037$) entre aumento do escore de gravidade clínica e a proporção de indivíduos do grupo destinado a receber a formulação nanoestruturada em relação aos do controle (Tabela 2, Figura 1).

Tabela 2 Proporção de animais destinados ao tratamento com formulação nanoestruturada por escore de gravidade dos sinais clínicos, antes do primeiro tratamento

Escore	Nano	Controle	Total	Proporções
1	4	6	10	0,400
2	5	7	12	0,417
3	7	2	9	0,778
4	2	0	2	1,000
Total	18	15	33	1,000

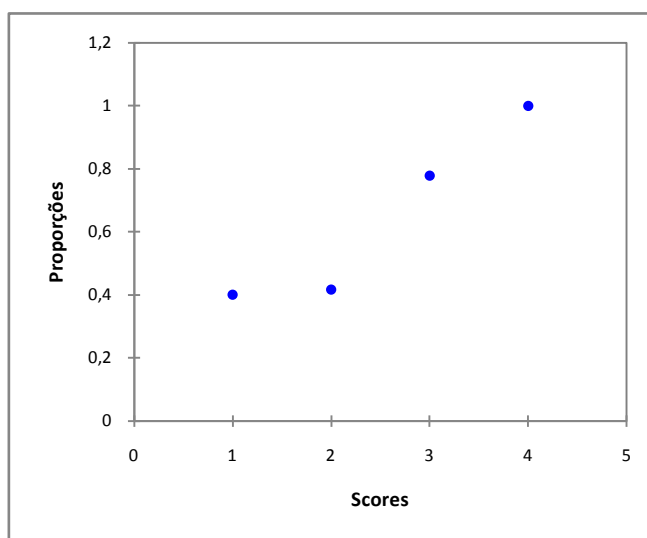


Figura 1 Relação direta entre aumento dos escores clínicos de gravidade e proporções de animais destinados ao tratamento com formulação nanoestruturada, antes do primeiro tratamento.

ii) Na primeira avaliação, esta tendência se inverteu para inversa e significativa ($p=0,001$) entre o aumento do escore das lesões e a proporção de indivíduos do grupo tratado com a formulação nanoestruturada em relação aos do controle (Tabela 3, Figura 2).

Tabela 3 Proporção de animais tratados com formulação nanoestruturada por escore de gravidade dos sinais clínicos, após o primeiro tratamento

Escores	Nano	Controle	Total	Proporções
1	15	4	19	0,789
2	3	7	10	0,300
3	0	4	4	0,000
Total	18	15	33	1,000

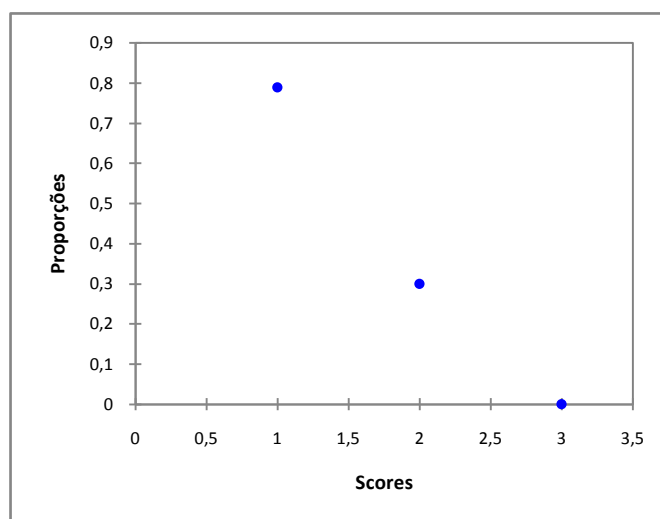


Figura 2 Relação direta entre aumento dos escores clínicos de gravidade e proporções de animais tratados com formulação nanoestruturada, após o primeiro tratamento

iii) Na segunda avaliação, a tendência inversa significativa ($p = 0,007$) permaneceu, sendo que à medida que aumentava o escore de gravidade a proporção de indivíduos do grupo submetido à formulação nanoestruturada diminuía em relação aos do controle (Tabela 4, Figura 3).

Tabela 4 Proporção de animais tratados com formulação nanoestruturada por escore de gravidade dos sinais clínicos, após o segundo tratamento

Escore	Nano	Controle	Total	Proporções
1	16	10	26	0,615
2	0	5	5	0,000
3	0	2	2	0,000
Total	18	15	33	1,000

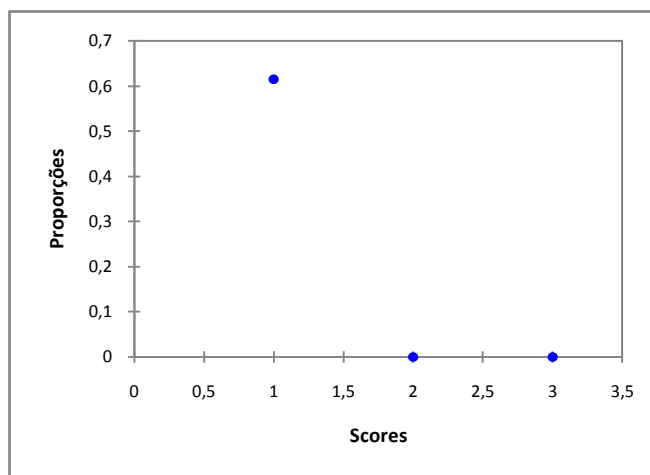


Figura 3 Relação direta entre aumento dos escores clínicos de gravidade e proporções de animais tratados com formulação nanoestruturada, após o segundo tratamento

Por outro lado, a comparação da tendência de evolução da gravidade dos sinais clínicos entre indivíduos do grupo tratado com a formulação oleosa e controle apresentou os seguintes resultados: i) Antes da primeira avaliação, houve uma tendência linear direta significativa ($p < 0,001$) entre o escore das lesões e a proporção de indivíduos do grupo convencional em relação ao controle. ii) Após a primeira avaliação, esta tendência modificou-se mas não se verificou uma linear inversa significativa ($p=0,23$) entre o aumento do escore de gravidade e a proporção de indivíduos do grupo convencional, em comparação ao controle. iii) Na segunda avaliação, a modificação da tendência anterior ao primeiro tratamento modificou-se, mas continuou não sendo detectada uma relação direta significativa ($p = 0,18$) entre aumento do escore de gravidade e as proporções de indivíduos do grupo convencional em comparação ao controle.

Tabela 5 Regressão logística linear para permanência de positividade ao exame microbiológico, nos grupos que receberam a formulação nanoestruturada, a formulação oleosa e o controle, na primeira e na segunda avaliação

Grupo	Total	Primeira avaliação			Segunda avaliação		
		Positivos (%)	Odds Ratio (IC 95%)	p-valor	Positivos (%)	Odds Ratio (IC 95%)	p-valor
Formulação nanoestruturada	16	13 (81,3) ^A	1,00	-	7 (43,8) ^A	1,00	-
Formulação oleosa	13	11 (84,6) ^A	1,26 (0,17-9,02)	0,85	10 (76,9) ^A	4,28 (0,84-21,76)	0,07
Controle	17	15 (88,2) ^A	1,73 (0,24-12,00)	0,57	15 (88,2) ^B	9,64 (1,63-56,91)	0,012
TOTAL	46	39 (84,7)		0,85	32 (69,5)		0,016

As letras maiúsculas diferem entre si com $p < 0,05$. IC – intervalo de confiança.

Com relação à positividade microbiológica (persistência do agente na superfície ocular): i) na primeira avaliação não foi possível verificar diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$) (Tabela 5); ii) na segunda avaliação, houve diferenças significativas entre o grupo que recebeu a formulação nanoestruturada e controle ($p = 0,012$), valores próximos da significância ($p = 0,07$) entre o grupo tratado com a formulação oleosa e o tratado com as nanopartículas, mas diferença significativa não foi detectada quando se comparou o grupo tratado com a formulação oleosa e o controle ($p = 0,41$).

Na segunda avaliação, houve uma tendência linear crescente de persistência de positividade microbiológica ($p = 0,0108$) no sentido do grupo que recebeu as nanopartículas, grupo tratado com a formulação oleosa e grupo controle, respectivamente. A chance de persistência de animais positivos no grupo controle foi de 9,64 (IC 95% 1,63-56,91) vezes a do grupo tratado com a formulação nanoestruturada ($p = 0,012$).

Dos 16 animais positivos na análise microbiológica no grupo que recebeu a formulação nanoestruturada, 81,3% ($n = 13$) apresentaram isolamento do agente da superfície ocular, na primeira avaliação (Tabela 5), 18,75% dos animais ($n = 3$) foram diagnosticados como negativos e permaneceram negativos e assintomáticos até o fim do experimento. Onze animais que compunham o grupo que recebeu a formulação oleosa (84,60%) permaneceram positivos no exame microbiológico após a primeira aplicação (Tabela 5). Os bezerros desse grupo que se tornaram negativos no exame microbiológico permaneceram negativos até o fim do experimento, foi observada também a cura clínica deles. No grupo controle, 88,2% ($n = 15$) dos animais permaneceram positivos (Tabela 5),

dois se tornaram negativos (11,8%) pelo isolamento microbiológico, também no dia 6.

No grupo tratado com a formulação nanoestruturada, 43,8% dos animais ainda apresentavam o agente na superfície ocular de acordo com o exame microbiológico (Tabela 5), na segunda avaliação. No grupo que recebeu a formulação oleosa, 76,5% dos bezerros foram positivos no isolamento do agente da superfície ocular. Já no grupo controle, 88,2% ainda apresentavam *M. bovis* na superfície ocular, também no dia 9.

4 DISCUSSÃO

Observou-se uma maior taxa de cura clínica no grupo tratado com o medicamento nanoestruturado, o que sugere uma melhor efetividade dessa formulação na superfície ocular, considerando-se que as duas formulações apresentavam a mesma concentração de cloxacilina. É possível inferir que essa diferença é devida ao poder adesivo das nanopartículas na mucosa ocular permitindo que o fármaco permaneça na camada estacionária de lágrima por tempo mais prolongado, corroborando com Sosnik, Neves e Sarmento (2014) e Sultana et al. (2011). A capacidade de adesão é devida à atração eletrostática que ocorre entre o ácido siálico presente na camada de mucina da superfície ocular, que apresenta carga negativa, e as nanopartículas catiônicas utilizadas. Soma-se a isso, a possibilidade de liberação sustentada do fármaco proporcionada pelo polímero que forma a parede desse nanocarreador (MOSQUEIRA; ARAUJO; BRANDÃO, 2011).

Os resultados sugerem, por outro lado, que somente uma aplicação não tenha sido suficiente para eliminação do agente da superfície ocular nessas condições, já que não houve uma redução significativa do número de isolamentos de *M. bovis* da superfície ocular entre os três grupos testados na primeira avaliação. Provavelmente, não foi possível atingir a concentração inibitória constante necessária para eliminação do agente. Outro fator a ser considerado é a capacidade de formação de biofilme por *M. bovis*, o que pode influenciar na efetividade dos fármacos na superfície ocular (PRIETO et al., 2013).

Entretanto, na segunda avaliação a formulação nanoestruturada mucoadesiva se mostrou significativamente mais eficaz na redução da carga microbiana e dos sinais clínicos quando comparada ao grupo controle. Assim, pode-se inferir que, após a segunda aplicação, foi possível obter concentração inibitória mínima por tempo suficiente para a eliminação do agente na superfície ocular de grande parte dos animais que receberam a formulação nanoestruturada. Portanto, um dos grandes inconvenientes do tratamento tópico, que é a necessidade de intenso manejo para realização de várias aplicações, foi reduzido com a nova metodologia de tratamento. Com a utilização dessa nova formulação de cloxacilina foi possível eliminar os sinais clínicos de todos os animais com poucas aplicações (duas), semelhante aos achados de Chandasana et al. (2014) e Leonardi et al. (2015).

A cura clínica é importante, no entanto, presença do agente na superfície ocular de animais que não tiveram sinais clínicos ou que já se recuperaram clinicamente tem um grande impacto no controle da doença, uma vez que atuam como mantenedores do agente no rebanho (CONCEIÇÃO; TURNES, 2003). Vale ressaltar a importância do teste microbiológico para determinar a presença ou ausência de *M. bovis* na superfície ocular, não só para selecionar animais experimentalmente como para monitorar a presença do agente no rebanho ou após realização de tratamento. É possível isolar *M. bovis* tanto de animais saudáveis que não apresentaram a doença clínica, quanto de animais que se recuperaram da doença (CONCEIÇÃO; TURNES, 2003). Alexander (2010) reforça a necessidade da realização de exames oculares via swab para determinar a presença do agente, para diagnóstico diferencial e definição do tratamento

a ser adotado. No entanto, somente um resultado não é suficiente para determinar se o animal possui ou não o microrganismo na superfície ocular, sendo necessários pelo menos dois diagnósticos negativos consecutivos (GOULD et al., 2013), o que muitas vezes fica inviável na rotina clínica (ALEXANDER, 2010).

Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos tratados com relação ao isolamento do agente, mais da metade dos animais (76,9%) que receberam a formulação oleosa ainda estavam infectados, na avaliação após o segundo tratamento. Vale ressaltar que houve forte tendência de redução do escore da gravidade das lesões clínicas no grupo tratado com o medicamento nanoestruturado em relação aos demais grupos.

Os resultados indicam que o tratamento com a formulação oleosa se mostrou menos efetivo no combate a CIB, quando comparado ao grupo tratado com a formulação nanoestruturada. Por sua vez, Daigneault e George (1990) e George, Keefe e Daigneault (1989) comprovaram a eficácia da utilização da cloxacilina solubilizada em óleo mineral, na mesma concentração utilizada no presente trabalho e observaram a cura clínica dos animais. Diferenças como estação do ano, luminosidade, manejo (WEBBER; SELBY, 1981), pela estirpe bacteriana e sua susceptibilidade antimicrobiana (CONCEIÇÃO et al., 2004) e variações no protocolo de tratamento (DAIGNEAULT; GEORGE, 1990) podem influenciar os resultados de pesquisas em nível de campo.

A efetividade das nanopartículas mucoadesivas de cloxacilina, formulação de caráter inovador para o tratamento da CIB, evidencia o potencial terapêutico da utilização de nanocarreadores. Estudos

complementares, tais como relação dose/resposta, são necessários para verificar o limiar terapêutico dessa formulação em afecções oculares de bovinos.

5 CONCLUSÃO

O tratamento da ceratoconjuntivite infecciosa bovina é um desafio devido aos inconvenientes de cada via de aplicação. A utilização de nanopartículas poliméricas mucoadesivas conferiu ganhos terapêuticos, promovendo recuperação mais rápida dos sinais clínicos e melhoria na taxa de cura microbiológica. Assim, o uso desses nanocarreadores pode ser uma alternativa inovadora capaz de contornar as dificuldades na terapêutica dessa afecção.

Clinical potential of mucoadhesive cloxacillin nanoparticles in the treatment of infectious bovine keratoconjunctivitis

ABSTRACT

The infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) is an important ocular disease that attacks oxen all over the world. The use of injectable drugs in its treatment often present systemic effects and can leave residues in milk and meat. The topical application culminates in low systemic concentrations of the active principal and, on the other hand, is often precluded by handling difficulty, since many applications are required to reach a sufficient and constant concentration of antimicrobials for the elimination of the agent. In light of this, this work aimed at evaluating the efficiency of mucoadhesive cloxacillin nanoparticles, an innovative formulation for treating IBK. The disease was experimentally induced in 46 animals, both pure and crossbred, homogeneously divided into 3 groups. One group (n = 16) was treated with a suspension of cloxacillin nanoparticles, another (n = 13) received an oil based cloxacillin formulation and the control (n = 17) was not treated. The animals received 1 ml of the formulations, in the form of eye drops, in two applications with interval of 4 days between each. The animals underwent clinical evaluations and ocular microbiological exams. We observed a pronounced reduction of the clinical signs in the group receiving the nanostructured formulation when compared to the remaining groups ($p < 0.05$) after the first and second applications, days 6 and 9, respectively. Regarding the isolation of the agent, there was no significant difference in the comparison of the groups treated after the first ($p = 0.85$) and second ($p = 0.07$) treatment, however, there was significant difference between the group treated with the nanostructured formulation and the control ($p = 0.012$). The results indicate that the nanostructured formulation was more effective in reducing clinical signs and bacterial load when compared to the remaining groups.

Keywords: Pinkeye. Mucoadhesive nanoparticles. Cloxacillin.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, D. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review of cases in clinical practice. **Veterinary Clinical Food Animals**, Philadelphia, v. 26, n. 3, p. 287-503, Nov. 2010.

ANGELOS, J. A.; BALL, L. M. Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other moraxella by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 19, n. 15, p. 532-534, Sept. 2007.

BROWN, M. H. et al. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 12, n. 4, p. 259-266, July 1998.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **EPI Info™ for Windows**. Version 3.5.3. Atlanta, Division of Public Health Surveillance and Informatics, 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/epiinfo/downloads.html>>. Acesso em: 19 out. 2014.

CHANDASANA, H. et al. Corneal targeted nanoparticles for sustained natamycin delivery and their PK/PD indices: an approach to reduce dose and dosing frequency. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 477, n. 1/2, p. 317-325, Dec. 2014.

CONCEIÇÃO, F. R. Antibiotic susceptibility of *Moraxella bovis* recovered from outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis in Argentina, Brazil and Uruguay between 1974 and 2001. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 364-366, Dec. 2004.

CONCEIÇÃO, F. R.; TURNES, C. G. *Moraxella bovis*: influência das características genóticas e fenóticas no controle da Ceratoconjuntivite Infecciosa Bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 4, p. 778-787, jul./ago. 2003.

DAIGNEAULT, J.; GEORGE, L. W. Topically applied benzathine cloxacillin for treatment of experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 51, n. 3, p. 376-380, Mar. 1990.

FUNK, L. et al. A randomized and blinded field trial to assess the efficacy of an autogenous vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in beef calves. **Vaccine**, Kidlington, v. 27, n. 34, p. 4585-4590, July 2009.

GEORGE, L. W.; KEEFE, T.; DAIGNEAULT, J. Effectiveness of two benzathine cloxacillin formulations for treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 50, p. 1170-1174, 1989.

GERHARDT, R. R. et al. The role of face flies in an episode of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 180, p. 156-159, 1982.

GERN, J. et al. Avaliação *in vitro* de cloxacilina nanoencapsulada contra diferentes isolados de moraxella. In: WORKSHOP DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, 7., 2013, São Carlos. **Anais...** São Carlos: EMBRAPA Instrumentação, 2013. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-leite/saude/artigos/avaliacao-vitro-cloxacilina-nanoencapsulada-t1939/165-p0.htm>>. Acesso em: 2 mar. 2015.

GOULD, A. S. et al. A Randomized blinded challenge study to assess association between *Moraxella bovoculi* and Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in dairy calves. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 164, n. 1/2, p. 108-115, May 2013.

IN SILICO. Project Suport for the Life Sciences. **Statistical calculatos**. Disponível em: <http://in-silico.net/tools/statistics/ficher_exact_test>. Acesso em: 10 nov. 2014.

LEIONARDI, A. et al. Cationic solid lipid nanoparticles enhance ocular hypotensive effect of melatonin in rabbit. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 478, n. 1, p. 180-186, Jan. 2015.

MCCONNEL, C. S.; SHUM, L.; HOUSE, J. K. Infectious bovine keratoconjunctivitis antimicrobial therapy. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 85, n. 1/2, p. 65-69, Jan. 2007.

MOSQUEIRA, V. C. F.; ARAUJO, R. S.; BRANDÃO, H. M. **Nanoparticulate composition containing antibiotics composition containing antibiotics for intramammary administration in animals**. WIPO US n. WO/2011/150481, 8 Dec. 2011.

O`CONNOR, A. M. et al. A review of randomized clinical trials reporting antibiotic treatment of infectious bovine keratoconjunctivitis in cattle. **Animal Health Research**, Cambridge, v. 7, n. 1/2, p. 119-127, June 2007.

POSTMA, G. C.; CARFAGNINI, J. C.; MINATEL, L. *Moraxella bovis* pathogenicity: an update. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 31, n. 6, p. 449-458, Nov. 2008.

PRIETO, C. et al. Evaluation of biofilm-forming capacity of *Moraxella bovis*, the primary causative agent of infectious bovine keratoconjunctivitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 166, p. 504-515, 2013.

ROSENBERGER, G.; STOBER, M. **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 369 p.

SOSNIK, A.; NEVES, J.; SARMENTO, B. Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: a review. **Progress in Polymer Science**, Emlsford, v. 39, n. 12, p. 2030-2075, Dec. 2014.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS 9.1.3 help and documentation**. Cary, 2004. Software.

SULTANA, Y. et al. Nanotechnology in ocular delivery: current and future directions. **Drugs of Today**, Barcelona, v. 47, n. 6, p. 441-455, June 2011.

WEBBER, J.; SELBY, L. Risk factors related to the prevalence of infectious bovine keratoconjunctivitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 179, p. 823-826, 1981.

XLSTAT. Disponível em: <<http://www.xlstat.com/en/>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Material Suplementar

Controle do processo de síntese das nanopartículas

Metodologia

Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A distribuição de tamanho das partículas e o potencial Zeta foram determinados por Espalhamento dinâmico de luz (DLS), com o auxílio do equipamento Nanosetazizer (Malvern Instruments- Malvern, England).

As análises foram realizadas em duplicata, para cada amostra, com suspensões de 1,5 mL de nanopartículas, acondicionadas em cubeta apropriada (DTS1060, Malvern Instruments- Malvern, England). A temperatura de análise foi de 25°C e o equipamento foi calibrado para realizar dez mensurações por análise.

Microscopia de Força Atômica (AFM)

A análise de microscopia de força atômica (AFM) foi realizada em uma AFM NanoSurf (NanoSurf, Suíça) com controlador modelo Easyscan 2. Para tanto, amostras das nanocápsulas foram depositadas sobre uma superfície de mica e secas em um dessecador de borosilicato

contendo sílica gel. Para o processo de varredura foi utilizada uma ponteira Tap 190 Al-G (BudgetSensor, Bulgária) em módulo não contato, com os parâmetros: Time/line 1/s; setpoint 54%; amplitude 200mV; e área de escaneamento de 25/25 micrômetros.

Resultados

Para controle do processo de síntese das nanopartículas a formulação nanoestruturada foi analisada por espalhamento dinâmico de luz (DLS) (Figura 4) e por microscopia de força atômica (AFM) (Figura 5). Quando as nanopartículas foram analisadas por DLS identificou-se que a maioria das partículas variou de tamanho entre 342 e 450nm. O potencial zeta, medida que reflete o potencial elétrico da superfície das partículas, obtido foi de 21,53mV, o que caracteriza as partículas como catiônicas. Essa característica favorece a interação eletrostática atrativa entre a nanopartícula com balanço de carga positiva e a mucina (aniônica) da superfície ocular.

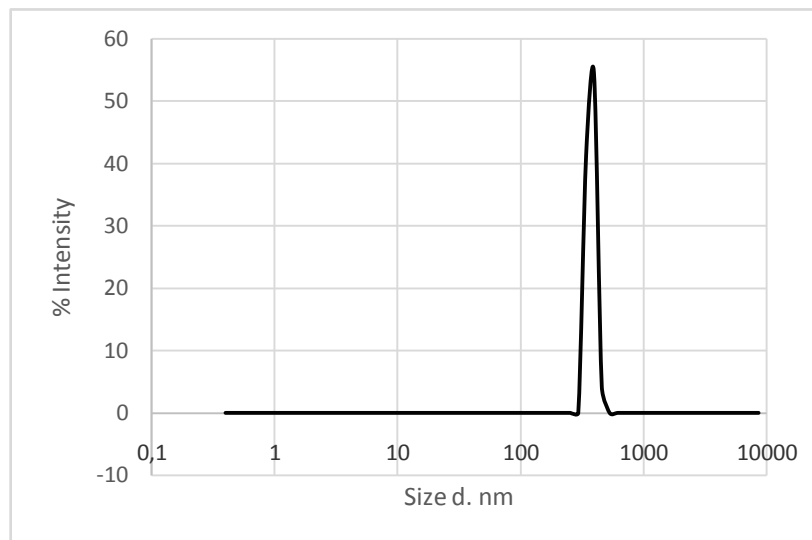


Figura 4. Distribuição de tamanho das nanopartículas mucoadesivas de cloxacilina, determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Ao analisar a topografia das nanopartículas depositadas sobre a mica pela AFM, pode-se observar que o material particulado apresentou características compatíveis com estruturas esféricas e com altura (*i.e.* diâmetro) variando entre 280 a 600nm, (Figura 5) corroborando com as análises por DLS.

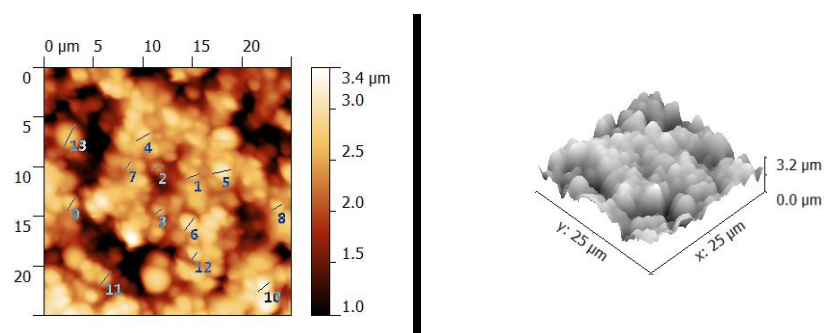


Figura 5. Análise topográfica de um agregado de nanopartículas mucoadesivas de cloxacilina, que variam de 280 a 600nm, obtida por microscopia de força atômica.

Avaliação dos sinais clínicos

Os animais passaram por exames clínicos diários e de acordo com o grau de sintomatologia foram classificados de 1 a 5, como exemplificado abaixo. Os animais classificados com grau 1 não apresentaram sinais clínicos; grau 2, apresentaram lacrimejamento e hiperemia; grau 3, úlcera menor que 0,3 cm; grau 4, úlcera entre 0,3 e 0,6 cm e grau 5, úlcera maior que 0,6 cm, adaptado de Daigneault e George (1990).

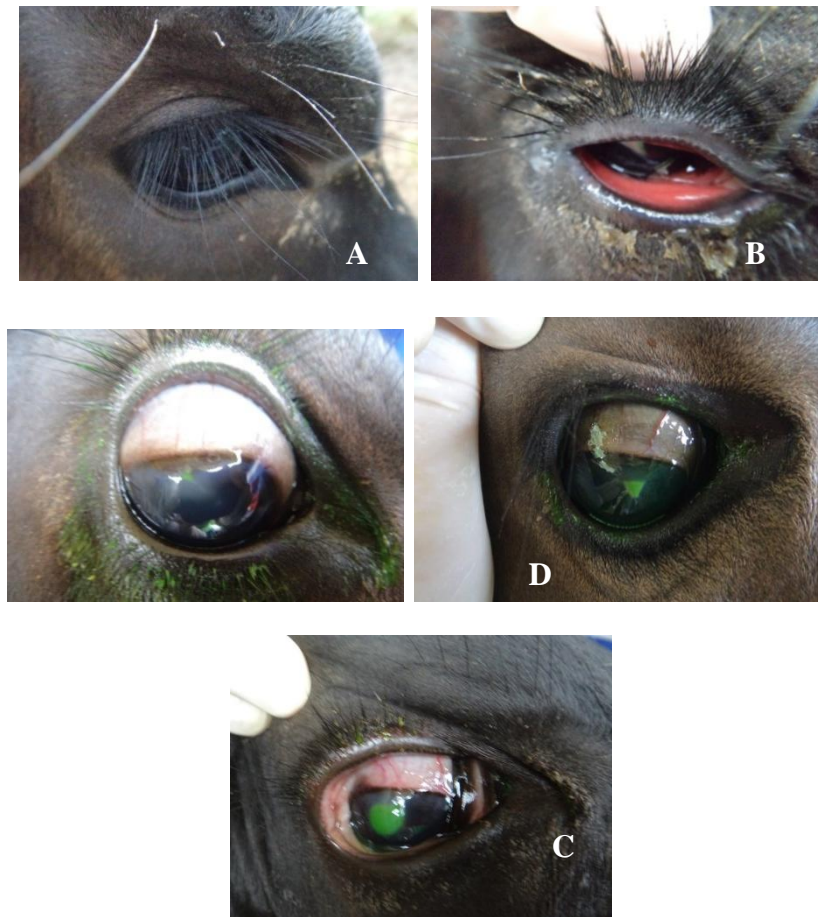


Figura 6. Imagem ilustrativa do padrão de classificação dos sinais clínicos adotados no trabalho experimental. A - grau 1, sem sinais clínicos; B - grau 2, lacrimejamento e hiperemia; C - grau 3, úlcera menor que 0,3 cm; D - grau 4, úlcera entre 0,3 e 0,6 cm e grau 5, E - úlcera maior que 0,6 cm.