



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas



**AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA DO LEVOFLOXACINO EM
EQUINOS E DO PERFIL ANTIBACTERIANO PARA CONSTRUÇÃO DO REGIME
POSOLÓGICO**

Evelin dos Santos Martins Teodoro

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosângela Gonçalves Peccinini

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Hussni

ARARAQUARA
2021

EVELIN DOS SANTOS MARTINS TEODORO

**AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA DO LEVOFLOXACINO EM EQUINOS E
DO PERFIL ANTIBACTERIANO PARA CONSTRUÇÃO DO REGIME
POSOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosângela Gonçalves Peccinini

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Hussni

ARARAQUARA
2021

T386a

Martins Teodoro, Evelin dos Santos.

Avaliação da farmacocinética do levofloxacino em equinos e do perfil antibacteriano para construção do regime posológico / Evelin dos Santos Martins Teodoro. – Araraquara: [S. n.], 2021. 90 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Rosangela Gonçalves Peccinini.

Coorientador: Carlos Alberto Hussni.

1. Antimicrobianos. 2. Fluoroquinolonas. 3. Levofloxacino. 4. Veterinária. 5. Equinos. 6. Saúde única. 7. CLAE. 8. Farmacocinética. 9. Farmacodinâmica. 10. Regime posológico. I. Peccinini, Rosangela Gonçalves, orient. II. Hussni, Carlos Alberto, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA DO LEVOFLOXACINO EM EQUINOS E DO PERFIL ANTIBACTERIANO PARA CONSTRUÇÃO DO REGIME POSOLÓGICO

AUTORA: EVELIN DOS SANTOS MARTINS TEODORO

ORIENTADORA: ROSANGELA GONCALVES PECCININI

COORIENTADOR: CARLOS ALBERTO HUSSNI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSANGELA GONCALVES PECCININI (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Prof. Dr. CELSO ANTONIO RODRIGUES (Participação Virtual)
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP

Dra. JULIANA DE MOURA ALONSO (Participação Virtual)
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP

Prof. Dr. MICHEL LEANDRO DE CAMPOS (Participação Virtual)
Instituto de Ciências da Saúde / Universidade Federal do Mato Grosso - Campus Sinop

Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 27 de outubro de 2021

RESUMO

O levofloxacino (LEV) é um antimicrobiano da classe fluoroquinolona, que pode ser eficaz em diversos tratamentos de infecções em equinos envolvendo bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas. Entretanto, é comum na medicina veterinária, extrapolação empírica dos regimes posológicos humanos, o que pode levar ao uso inadequado do medicamento e contribuir para o desenvolvimento de resistência bacteriana. Com o objetivo de projetar um regime posológico racional, o LEV foi estudado em cavalos (n=6) após administração intravenosa e oral de uma dose única de 4 mg/kg. As concentrações do fármaco no plasma foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado a um detector de espectrometria de massa. Através de análise compartimental, foram determinados os parâmetros farmacocinéticos. A concentração necessária para inibir 90% dos isolados bacterianos (CIM₉₀) foi avaliada para cepas padrão de bactérias comuns em infecções equinas. Os valores dos índices de eficácia antimicrobiana (ASC/CIM, C_{MÁX}/CIM, T>CIM) foram calculados e usados para determinar regimes de posológicos racionais para bactérias alvo. O *clearance* do LEV foi 6,86 ± 2,09 mL/min/kg e a meia-vida terminal de 3,84 ± 0,52 horas. A biodisponibilidade absoluta do LEV após administração oral foi de 73 ± 19%. A CIM₉₀ foi de 0,016 µg/mL para *E. coli*, 0,25 µg/mL para *S. aureus* e *Salmonella* spp. e 0,625 µg/mL para *P. aeruginosa*. Considerando os valores dos pontos de corte dos índices de eficácia, um regime de dosagem de LEV de 4 mg/kg/dia é apropriado para tratar infecções por microrganismos Gram-negativos com CIM₉₀ ≤0,08 µg/mL pela via oral e com CIM₉₀ ≤0,11 µg/mL pela via intravenosa, assim como, tratar infecções por microrganismos Gram-positivos com CIM₉₀ ≤0,21 µg/mL e 0,29 µg/mL pela via oral e intravenosa, respectivamente. Porém, é necessário um regime posológico com doses de 8,95 mg/kg/dia (via oral) e 12,26 mg/kg/dia (via intravenosa) para *S. aureus* e de 22,38 mg/kg/dia (via oral) e 30,66 mg/kg/dia (via intravenosa) para *P. aeruginosa*. Concluímos que, devido ao seu amplo espectro de atividade e comportamento farmacocinético favorável, o LEV tem potencial para tratar uma ampla variedade de infecções bacterianas em equinos.

Palavra-chave: Antimicrobianos, fluoroquinolonas, levofloxacino, veterinária, equinos, saúde única, CLAE, farmacocinética, farmacodinâmica, regime posológico.

ABSTRACT

Levofloxacin (LEV) is a fluoroquinolone antimicrobial, which can be effective in several treatments of Gram-negative and some Gram-positive bacterial infections in horses. However, empirical extrapolation of human dosage regimen is common in veterinary medicine, which might lead to inappropriate use of the drug and contribute to the development of bacterial resistance. In order to design a rational dosage regimen, LEV was studied in horses (n=6) after intravenous and oral administration of a single dose of 4 mg/kg. Drug concentrations in plasma were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) – tandem mass spectrometry detection method. The pharmacokinetic data were analyzed by a compartmental analysis. The minimum inhibitory concentration required to inhibit 90% of the bacteria (MIC₉₀) were assessed for standard strains bacteria common in equine infectious. The values of the antimicrobial efficacy indices (ASC/CIM, C_{MÁX}/CIM, T>CIM) were calculated. These data were used to determine rational dosage regimen for target bacteria. The clearance of LEV was 6.86 ± 2.09 mL/min/kg and the terminal half-life was 3,84 ± 0,52 hours. The absolute bioavailability of LEV after oral administration was 73 ± 19%. The CIM₉₀ was 0.016 µg/mL for *E. coli*, 0.25 µg/mL for *S. aureus* and *Salmonella* spp. and 0.625 µg/mL for *P. aeruginosa*. Considering the breakpoints values of the efficacy indices, a LEV dosage regimen of 4 mg/kg/day is appropriate to treat infections by Gram-negative microorganisms with MIC₉₀ ≤0.08 µg/mL by oral administration and with CIM₉₀ ≤0.11 µg/mL by intravenous administration, as well as, treating infections by Gram-positive microorganisms with MIC₉₀ ≤0.21 µg/mL and 0.29 µg/mL by intravenous and oral administration, respectively. However, a dosage regimen with doses of 8.95 mg/kg/day (orally) and 12.26 mg/kg/day (intravenously) for *S. aureus* and 22.38 mg/kg/day (orally) and 30.66 mg/kg/day (intravenously) for *P. aeruginosa*. We concluded that, due to its broad spectrum of activity and favorable pharmacokinetic behavior, LEV has the potential to treat a wide variety of bacterial infections in horses.

Key words: Antimicrobials, fluoroquinolones, levofloxacin, veterinary, equine, One Health, liquid chromatography, HPLC, pharmacokinetics, pharmacodynamics, dosage regimen.

SUMÁRIO

1	Introdução	18
2	Fundamentação Teórica	20
2.1	Farmacologia dos antimicrobianos	20
2.1.1	Farmacocinética	20
2.1.2	Farmacodinâmica	31
2.1.3	Modelo Farmacocinético-Farmacodinâmico (PK-PD)	34
2.2	Levofloxacino	37
2.2.1	Características físico-químicas	37
2.2.2	Indicação terapêutica e posologia	38
2.2.3	Efeitos adversos	38
2.2.4	Mecanismo de ação, efeito pós-antimicrobiano e resistência.....	39
2.2.5	Farmacocinética do LEV em humanos	39
2.2.6	Farmacocinética do LEV em animais	40
2.2.7	Farmacodinâmica do LEV e seu uso na veterinária	44
2.2.8	Farmacocinética-Farmacodinâmica do LEV	44
3	Objetivos	47
3.1	Objetivo geral	47
3.2	Objetivos específicos	47
4	Material e Métodos	47
4.1	Soluções padrões, solventes e reagentes.....	47
4.2	Equipamentos	48
4.3	Correlatos.....	48
4.4	Softwares	48
4.5	Desenvolvimento do método bioanalítico	49
4.5.1	Sistema Cromatográfico	49

4.5.2	Preparo da amostra	49
4.6	Validação do método bioanalítico.....	49
4.6.1	Seletividade	50
4.6.2	Sensibilidade	50
4.6.3	Efeito residual	50
4.6.5	Curva de calibração (Linearidade)	50
4.6.6	Precisão e Exatidão.....	51
4.6.7	Recuperação	51
4.6.8	Estabilidade de Armazenamento	52
4.7	Protocolo Clínico	52
4.7.1	Modelo Animal.....	52
4.7.2	Desenho do estudo.....	53
4.7.3	Administração dos fármacos.....	53
4.7.4	Coleta de sangue.....	53
4.7.5	Avaliação clínica	54
4.8	Análise Farmacocinética	54
4.9	Avaliação da atividade antibacteriana	55
4.9.1	Microrganismos	55
4.10	Modelo Farmacocinético-Farmacodinâmico (PK-PD)	59
4.11	Construção do regime posológico	59
4.12	Análise Estatística	60
5	Resultados e Discussão.....	60
5.1	Validação de método bioanalítico em plasma de equinos.....	60
5.1.1	Seletividade	60
5.1.2	Sensibilidade	61
5.1.3	Efeito residual	62
5.1.4	Curva de calibração.....	62

5.1.4 Precisão e exatidão	63
5.1.5 Recuperação	63
5.1.6 Estabilidade de armazenamento	64
5.2 Avaliação Clínica.....	64
5.3 Análise Farmacocinética (PK)	66
5.3.1 Plasma.....	66
5.4 Análise Farmacodinâmica (PD).....	71
5.4.1 Determinação da CIM e CBM	71
5.5 Farmacocinética e farmacodinâmica (PK-PD)	76
5.6 Construção do Regime Posológico	77
6 Considerações finais.....	79
6.1 Conclusão	79
Referências.....	81
ANEXO I	89
ANEXO II	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática (A) e representação gráfica do decaimento das concentrações (B) no modelo monocompartimental..	28
Figura 2 - Representação esquemática (A) e representação gráfica do decaimento das concentrações (B) no modelo bicompartimental..	29
Figura 3 - Relação da concentração do fármaco (%) <i>versus</i> tempo (meia-vida) na cinética de primeira ordem de eliminação.	30
Figura 4 - Relação da concentração plasmática do fármaco e da constante de eliminação na cinética de ordem zero.	30
Figura 5 - Relação da concentração plasmática ($\mu\text{g/mL}$) e dose (mg) em diferentes situações (A e B) de cinética de saturação.	31
Figura 6 - Índices PK-PD.	35
Figura 7 - Estrutura molecular do LEV	37
Figura 8 - Representação da microplaca para determinação da CIM.	57
Figura 9 - Reação de oxirredução da resazurina	58
Figura 10 - Cromatogramas da amostra branco (linha azul) e do padrão de calibração de levofloxacino no LIQ (linha vermelha).	61
Figura 11 - Cromatogramas da amostra branco (linha azul) e da amostra zero (linha vermelha).	61
Figura 12 - Curva de calibração da levofloxacina em plasma. Fonte: do autor (2020).	62
Figura 13 - Perfis farmacocinéticos das concentrações plasmáticas de levofloxacino (escala logarítmica) <i>versus</i> tempo (minutos) em equinos após administração intravenosa e oral na dose de 4 mg/kg (média \pm DP, n=6).	66
Figura 14 - Foto do ensaio de microdiluição com bactérias revelado com resazurina (0,01%).	72
Figura 15 - Foto do ensaio de concentração bactericida mínima (CBM) com bactérias.	72
Figura 16 - (A) Porcentagem de inibição das cepas bacterianas de E.coli, S. aureus e Samonella em diferentes concentrações de LEV. (B) Porcentagem de inibição da cepa bacteriana de P. aeruginosa em diferentes concentrações de LEV.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Farmacocinética do LEV em diversas espécies de animais.....	42
Tabela 2 - Descrição e método de cálculo dos parâmetros farmacocinéticos.....	54
Tabela 3 - Descrição, fórmula, unidade e alvo terapêutico dos índices de eficácia de PK-PD.	59
Tabela 4 - Exatidão e precisão dos padrões da curva de calibração.	62
Tabela 5 - Precisão e exatidão intracorrída e intercorrída do método bioanalítico de LEV.	63
Tabela 6 - Ensaio de recuperação do LEV em plasma.	63
Tabela 7 - Estabilidade de armazenamento do LEV em plasma.....	64
Tabela 8 - Resultados dos exames físicos de de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), tempo de preenchimento capilar (TPC) e temperatura retal (T_{retal}) (média \pm DP) e de coloração das mucosas e motilidade intestinal (n=6).	65
Tabela 9 - exames bioquímicos.....	65
Tabela 10 - Parâmetros farmacocinéticos do LEV (média \pm DP) determinados no plasma após administrações intravenosa e oral (4 mg/kg) em equinos (n=6).....	67
Tabela 11 - Atividade <i>in vitro</i> do LEV contra cepas padrão.....	73
Tabela 12 - Pontos de corte do LEV e do CIP de acordo com BrCAST (versão 10.0 de 2020)	75
Tabela 13 - Cálculo do índice PC/CIM do LEV, CIP e ENRO.	75
Tabela 14 - Valores dos índices de eficácia ASC/CIM (h), ASCI (h), $C_{\text{MÁX}}/\text{CIM}$ e $T > \text{CIM}$ (%) calculado a partir dos parâmetros farmacocinéticos obtido após a administração de 4 mg/kg de LEV em cavalos (n=6). Os dados são apresentados como média \pm DP.	76
Tabela 15 - Doses diárias de LEV calculadas para cada microrganismo, considerando um CI de 411,6 mL/h/kg, F de 73% e ASC/CIM de 87 (Gram-negativos) e 34 (Gram-positivos).	78

LISTA DE ABREVIÇÕES

- ADME – absorção, distribuição, metabolização e excreção
- AMH – ágar Müeller-Hinton
- ASC – área sob a curva
- ASMC – área sob o momento da curva
- ASMC_{0-INF} – Área sob o momento da curva de zero extrapolada ao infinito
- ASMC_{0-T} – Área sob o momento da curva de zero ao último tempo quantificável
- BrCAST – *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- CBM – concentração bactericida mínima
- CIM – concentrações inibitórias mínimas
- CIM₅₀ – concentração antimicrobiana que inibe 50% das cepas bacterianas
- CIM₉₀ – concentração necessária para inibir 90% dos isolados
- CIP – ciprofloxacino
- CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
- CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- C_{MÁX} – concentração plasmática máxima
- CMH – caldo Muller Hinton
- C_{MÍN} – concentração plasmática mínima
- CQA – controle de qualidade alto
- CQB – controle de qualidade baixo
- CQD – controle de qualidade diluído
- CQM – controle de qualidade médio alto
- CV – coeficiente de variação
- DC – débito cardíaco
- DP – desvio padrão
- E – taxa de extração corporal
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- ENRO – enrofloxacino
- EPR – erro padrão relativo
- ESI – ionização por eletrospray
- EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FC – frequência cardíaca

F_{oral} – biodisponibilidade oral

FR – frequência respiratória

HPLC – high performance liquid chromatography

K_a – constante de absorção meia vida de absorção

K_{el} ou β – constante de eliminação

LEV – levofloxacino

LIQ – limite inferior de quantificação

Log P – coeficiente de partição óleo-água do fármaco

LSQ – limite superior de quantificação

MARBO – marbofloxacino

MAT – tempo de absorção médio

MRT – tempo de residência médio do fármaco no organismo

MTT – tempo de trânsito médio

NOR – norfloxacino

PC – ponto de corte

PI – padrão interno

PK-PD – *pharmacokinetic e pharmacodynamic*

Q – fluxo sanguíneo no órgão eliminador

QDa – massas de quadrupolo único

SIR – monitorização selecionada dos íons

T>CIM – tempo em que a concentração plasmática excede o CIM

T_{1/2 K_a} - meia vida de absorção

T_{1/2 α} – Meia-vida de distribuição

TGI – trato gastrointestinal

T_{MÁX} – tempo de ocorrência da C_{MÁX}

TPC – tempo de preenchimento capilar

T_R – tempo de retenção

T_{retal} – temperatura retal

T_{ss} – tempo para atingir o estado de equilíbrio

V_{área} – volume de distribuição de pseudoequilíbrio

V_c – volume de distribuição no compartimento central

V_d – volume de distribuição

V_i – volume de distribuição inicial

V_{ss} – volume de distribuição no estado de estacionário

α – constante de distribuição

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais Clóvis e Vanda e ao meu esposo Gustavo, por me ajudarem e incentivarem durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por cuidar de cada detalhe desse trabalho de maneira tão especial e perfeita, através de pessoas e situações que contribuíram para que tudo acontecesse da melhor forma.

Aos meus pais Clóvis e Vanda, por todo suporte durante minha vida, por sempre me incentivarem e se preocuparam comigo. Com certeza, a oração de vocês por mim foi fundamental para que tudo isso fosse possível.

Ao meu esposo Gustavo, por seu meu companheiro sempre me incentivando e me motivando a realizar meus sonhos. Com você ao meu lado, me sinto mais segura para enfrentar os desafios.

Ao meu irmão, cunhada, sogros e demais familiares por sempre torcerem por mim e se alegrarem com as minhas conquistas.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Rosângela Gonçalves Peccinini, por me guiar e orientar desde a iniciação científica até o doutorado. Seu amor pela farmacocinética foi o que me inspirou a seguir essa jornada.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Carlos Alberto Hussni, que me recebeu de braços abertos no Hospital Veterinário da FMVZ de Botucatu. Obrigada por todo esforço feito para que esse trabalho se concretizasse, sua ajuda e orientação foram fundamentais para mim.

À Dr.^a Juliana de Moura Alonso, que mesmo durante a gestação da sua filha e quando ela ainda estava recém-nascida, contribuiu com todo seu conhecimento e experiência durante os experimentos. Admiro sua competência e profissionalismo.

Ao Dr. José Ricardo Barboza Silva, que participou de toda parte experimental, sempre muito disposto a ajudar em tudo que precisasse. Obrigada também pela companhia e pelas conversas durante os intervalos dos experimentos.

A todos os residentes do Hospital Veterinário da FMVZ, em especial a Isabella Barros, que voluntariamente contribuiu de forma significativa durante os experimentos, sempre com muita competência e disposição.

Ao meu amigo e compadre Jonata Augusto de Oliveira, pelas risadas e momentos de descontração, que foram fundamentais para enfrentar os momentos de desespero. Muito bom poder contar com você sempre que precisar.

A minha estagiária Fernanda Lara Machado, por todo seu esforço em aprender e por ser meu braço direito durante as análises no laboratório.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, pela estrutura disponibilizada.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, pela estrutura disponibilizada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da pesquisa (processo nº 88882.180448/2018-01).

1 Introdução

Durante muito tempo, a sociedade viu a medicina veterinária, principalmente, como uma disciplina médica de saúde animal. Nos últimos anos, ameaças à saúde pública ajudaram muitos a perceber as ligações fundamentais entre a medicina veterinária e a saúde humana. A saúde dos seres humanos, animais e o meio ambiente estão interconectadas e compreender essa interdependência torna-se ainda mais relevante para nossa saúde e segurança coletivas. O conceito de Saúde Única (*One Health*) vem se destacando recentemente e refere-se ao esforço colaborativo de várias disciplinas trabalhando localmente, nacionalmente e globalmente para alcançar a saúde ideal para pessoas, animais e meio ambiente (AVMA, 2020).

Na medicina veterinária, é comum a prescrição de medicamentos aprovados para uso humano a diferentes espécies animais. Entretanto a prescrição é frequentemente realizada através da extrapolação empírica dos regimes posológicos, o que pode levar ao uso inadequado do medicamento tendo em vista as particularidades fisiológicas de cada espécie. O uso empírico de medicamentos, em especial dos antimicrobianos, aumenta o risco de utilização de subdoses e ocorrência de resistência bacteriana ou de doses excessivas e ocorrência de efeitos tóxicos (FREITAS; CARREGARO, 2013; RATH, 2015).

A resistência bacteriana é uma crise global de saúde pública e os principais fatores que contribuem para isso são: dose inadequada, administração em intervalos irregulares e seleção de fármaco pouco ativo para o patógeno envolvido. Uma das estratégias para o uso racional de antimicrobianos na medicina veterinária e humana é a determinação da relação entre as concentrações plasmáticas – e os parâmetros farmacocinéticos obtidos *in vivo* durante a exposição aos antimicrobianos (farmacocinética) – com a susceptibilidade microbiana aos antibióticos *in vitro* através da CIM (farmacodinâmica) (ALIABADI; LEES, 2000; PAPICH, 2014; LUO et al., 2019).

Esse modelo farmacocinético-farmacodinâmico (PK-PD, sigla originada das palavras em inglês *pharmacokinetic* e *pharmacodynamic*) permite a construção de um regime posológico adequado através da otimização dos principais índices PK-PD de eficácia, que são: (i) razão da área sob a curva (ASC) pelo CIM (ASC/CIM), (ii) razão entre concentração plasmática máxima ($C_{MÁX}$) e CIM ($C_{MÁX}/CIM$) e (iii) o tempo em que a concentração plasmática excede o CIM ($T > CIM$). Os dois primeiros índices são relacionados a antibióticos concentração-dependentes, e o terceiro índice é

relacionado a antibióticos tempo-dependentes. Desta forma a terapia antimicrobiana pode promover resultados clínicos mais efetivos e minimizar o desenvolvimento de resistência a antibióticos (TOUTAIN et al., 2002; PAPICH, 2014; YU et al., 2016).

Existem inúmeras indicações de potenciais tratamentos com fluoroquinolonas na medicina equina, que incluem infecções causadas pela maioria dos aeróbios Gram-negativos (BOUSQUET-MELOU et al., 2002; CARRETERO et al., 2002; LUO et al., 2019; BOUSQUET-MELOU et al., 2020). Dentre as opções economicamente viáveis tem-se o levofloxacino (LEV), uma fluoroquinolona de terceira geração que possui um espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas mais amplo que fluoroquinolonas de gerações anteriores, como ciprofloxacino (CIP) e norfloxacino (NOR) (ALBARELLOS et al., 2005; LOU et al., 2019).

O LEV possui ação concentração-dependente em bactérias Gram-negativas e tem capacidade de induzir um efeito pós-antibiótico contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BOUSQUET-MELOU et al., 2002). Sua biodisponibilidade oral em humanos é próxima a 100% e apresenta um perfil farmacocinético que possibilita a administração uma vez ao dia devido à sua rápida e alta distribuição nos tecidos e fluidos corporais (FISH; CHOW, 1997; GOUDAH et al., 2008).

Seu perfil farmacocinético tem sido investigado em muitas espécies animais, incluindo gatos (ALBARELLOS et al., 2005), codornas (ABOUBAKR, 2012), patos (ABOUBAKR; SOLIMAN, 2014), tartarugas (ABOUBAKR et al., 2014) bezerros (DUMKA; SRIVASTAVA, 2006), cavalos garanhões (GOUDAH et al., 2008), camelos (GOUDAH, 2009), cabras em lactação (GOUDAH; ABO-EL-SOUD, 2009), ovelhas (GOUDAH; HASABELNABY, 2010), coelhos (SITOVIS et al., 2020) e cachorros (MADSEN et al., 2020).

Apesar de Goudah et al. (2008) já terem estudado a cinética do LEV em cavalos após administração intravenosa e intramuscular, não há relatos da literatura sobre a cinética do LEV em cavalos após a administração oral. Além disso, Goudah et al. (2008) não propuseram o regime posológico adequado para nenhuma das vias de administração e relatam a necessidade de mais estudos, que não foram realizados até o presente.

Neste estudo, o objetivo foi avaliar a farmacocinética e os aspectos clínicos da administração do LEV em equinos pela via oral e intravenosa, bem como determinar a susceptibilidade de importantes cepas de microrganismos ao LEV e calcular

principais índices PK-PD de eficácia do antimicrobiano, a fim de estabelecer um regime posológico racional para o LEV em equinos.

2 Fundamentação Teórica

2.1 Farmacologia dos antimicrobianos

A farmacologia da terapia antimicrobiana pode ser separada em dois componentes distintos. O primeiro é a farmacocinética (PK), que envolve os processos de absorção, distribuição e eliminação dos antimicrobianos. Estes fatores envolvem a determinação das concentrações dos antimicrobianos no decorrer do tempo durante o regime de dosagem. O segundo é a farmacodinâmica (PD), que compreende a relação entre concentração e efeito antimicrobiano. Além disso, é possível realizar o modelo PK-PD, que considera os processos e parâmetros associados à PK e à PD, a fim de maximizar a eficácia e minimizar a toxicidade na terapia dos antimicrobianos (LODE et al., 1998).

2.1.1 Farmacocinética

2.1.1.1 Processos e parâmetros farmacocinéticos

A farmacocinética (PK) é estudo do movimento do fármaco no corpo depois de sua administração através da compreensão dos processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) (JANG et al., 2001; FAN et al., 2014; MARTINS, 2018).

Absorção é o processo de transporte das moléculas do fármaco inalterado do local de administração para a circulação sistêmica. A principal via de administração utilizada no cotidiano é a via oral devido sua facilidade e segurança. A absorção do fármaco do trato gastrointestinal (TGI) para circulação sistêmica envolve um processo complexo controlado por fatores como a solubilidade/dissolução do fármaco no TGI, a permeabilidade do composto para atravessar a membrana intestinal e o metabolismo pré-sistêmico (STORPIRTIS et al., 2011; FAN et al., 2014; MARTINS, 2018).

As propriedades físico-químicas do fármaco como solubilidade, lipofilicidade, tamanho molecular e carga, junto com as propriedades físico-químicas e fisiológicas do TGI determinam a taxa e a extensão da absorção do composto (FAN et al., 2014; MARTINS, 2018). Antes de serem absorvidos, os medicamentos em formas farmacêuticas sólidas são desintegrados em partículas, permitindo a dissolução dos

fármacos nos fluidos do TGI e, por conseguinte, disponibilizando as moléculas para absorção (FAN et al., 2014; MARTINS, 2018).

As moléculas lipofílicas pequenas geralmente são absorvidas por meio de difusão passiva a favor do gradiente de concentração. Moléculas grandes, altamente polares ou carregadas possuem capacidade de partição limitada nas bicamadas lipídicas da membrana e dependem da presença de transportadores ativos de influxo (AZEREDO et al., 2009; STORPIRTIS et al., 2011; FAN et al., 2014; MARTINS, 2018). A velocidade e a eficiência da absorção são influenciadas pela via de administração e da forma farmacêutica, bem como por diversos fatores como pK_a do fármaco, pH do TGI, presença de alimentos, motilidade intestinal, tempo de esvaziamento gástrico, eliminação pré-sistêmica (hepática, microbiota intestinal, enzimas metabólicas intestinais como citocromo P450 e glicoproteína-P) (BOROUJERDI, 1995; MARTINS, 2018).

O processo de absorção é caracterizado pelos parâmetros farmacocinéticos: concentração máxima ($C_{MÁX}$), tempo de ocorrência da $C_{MÁX}$ ($T_{MÁX}$), biodisponibilidade oral (F_{oral}), constante de absorção (K_a), meia vida de absorção ($T_{1/2 K_a}$) e tempo de absorção médio (MAT). $C_{MÁX}$ e $T_{MÁX}$ descrevem a velocidade de absorção e são obtidos experimentalmente através da análise do perfil farmacocinético. F_{oral} reflete a proporção de fármaco que é absorvido e disponibilizado para circulação sistêmica, sendo calculada a partir da área sob a curva (ASC), como esta demonstrada na **equação 1** (BOUSQUET-MELÓU, 2004d; STORPIRTIS et al., 2011; MARTINS, 2018):

(Eq. 1)

$$F_{oral} = \frac{ASC_{0-INF oral} \times Dose_{iv}}{ASC_{0-INF iv} \times Dose_{oral}}$$

Onde ASC_{0-INF} é a área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo extrapolada ao infinito e $dose_{iv}$ e $dose_{oral}$ são as doses realmente administradas para a avaliação de F.

K_a corresponde a inclinação da reta da fase de absorção e caracteriza a velocidade com que ocorre o processo de absorção (STORPIRTIS et al., 2011; FAN et al., 2014). $T_{1/2 K_a}$ reflete o desaparecimento do fármaco do local da administração (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004d) e é calculada de acordo com a **equação 2**:

(Eq. 2)

$$T_{1/2 Ka} = \frac{\ln 2}{K_a}$$

MAT indica o tempo médio que uma molécula permanece no local de entrada antes de ser absorvido (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004d; FAN et al., 2014), e é calculado através da **equação 3**:

(Eq. 3)

$$MAT = \frac{1}{K_a}$$

Distribuição é o processo de transferência reversível do fármaco dos líquidos corporais para os diversos tecidos e órgãos. A concentração plasmática de um fármaco depende de quanto ele é distribuído para sítios extra vasculares, sendo influenciado pelas características físico-químicas do fármaco, fluxo sanguíneo nos órgãos e tecidos, extensão da ligação a proteínas plasmáticas, diferenças de pH nos vários tecidos e coeficiente de partição óleo-água do fármaco (log P) (FAN et al., 2014; RANG; DALE, 2016; MARTINS, 2018). Dentre essas características, a taxa de ligação às proteínas plasmáticas desempenha um papel importante na distribuição do fármaco pelo corpo, uma vez que apenas o fármaco não ligado é capaz de entrar e sair dos compartimentos de plasma e tecido. As concentrações totais nos espaços intravasculares e extravasculares dependem das afinidades do fármaco nesses espaços para os diferentes componentes aos quais o fármaco se liga, e é a concentração do fármaco livre que regula a concentração total do fármaco (FAN et al., 2014).

O parâmetro farmacocinético que descreve a relação entre a quantidade do fármaco disponível na circulação sanguínea e a sua disponibilidade extravascular é o volume de distribuição (V_d), que representa o volume aparente necessário para conter todo fármaco do organismo na concentração observada no plasma (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004c; MARTINS, 2018). Fármacos que são altamente ligados as proteínas plasmáticas geralmente exibem um V_d pequeno, enquanto aqueles que são fracamente ligados as proteínas plasmáticas, exibem um V_d maior do que o volume fisiológico do corpo (FAN et al., 2014).

Vários tipos de V_d podem ser calculados para um fármaco, como o volume de distribuição no compartimento central (V_c) ou volume de distribuição inicial (V_i), o volume de distribuição de pseudoequilíbrio ($V_{\text{área}}$) e o volume de distribuição no estado de equilíbrio (V_{ss}) (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004c).

V_c representa a distribuição inicial de um fármaco no sangue e em tecidos com alta perfusão sanguínea, pertencentes ao compartimento central, antes que ocorra os processos de distribuição “definitivos” e eliminação (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004c). É possível calcular V_c somente nos casos de administração intravenosa, conforme pode ser observado na **equação 4**:

(Eq. 4)

$$V_c = \frac{Dose}{C_0}$$

Onde C_0 é estimado por extrapolação para o tempo zero da curva de disposição do fármaco e corresponde a uma concentração plasmática teórica inicial (tempo zero) resultante do aparecimento total do fármaco no sangue antes de qualquer eliminação ou distribuição definitiva para compartimentos extravasculares, o que geralmente é uma suposição fictícia, particularmente quando a velocidade de distribuição do fármaco para compartimentos extravasculares é relativamente menor à aquela da disponibilização sanguínea (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004c).

Quando o fármaco é distribuído instantaneamente pelo corpo após administração, V_c será o único V_d . Entretanto, muitos fármacos não possuem uma distribuição instantânea e, durante a fase de distribuição, a diminuição da concentração plasmática ocorrerá, principalmente, em função da partição do fármaco no corpo e não apenas da eliminação do fármaco (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004c; STORPIRTIS et al., 2011). Nesses casos, V_c é uma variável tempo-dependente que se expande após a administração até atingir um valor máximo de $V_{\text{área}}$ no pseudoequilíbrio.

O $V_{\text{área}}$ é o volume de distribuição calculado pelo método de área sob a curva da concentração plasmática pelo tempo e estima a distribuição de fármacos nos tecidos de todo o corpo durante o pseudoequilíbrio. Quando o pseudoequilíbrio de distribuição é alcançado, a troca entre compartimento central e os tecidos (compartimentos periféricos) é nula e a diminuição da concentração plasmática é apenas em função da eliminação irreversível do fármaco (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004c). O $V_{\text{área}}$ é definido pela **equação 5**:

(Eq. 5)

$$V_{\text{área}} = \frac{Cl}{K_{el}} = \frac{Dose \times F}{ASC_{0-1NF}} \times \frac{1}{K_{el}}$$

Onde F é o fator de biodisponibilidade de 0 a 1 e K_{el} é a constante de eliminação.

V_{ss} representa a distribuição do fármaco no estado de equilíbrio, em que a taxa de entrada do fármaco compensa a taxa de saída dos tecidos. O V_{ss} é independente do *clearance* (Cl), sendo recomendado para situações onde o Cl é nulo ou praticamente nulo, como nos casos de infusão contínua ou em administrações de doses múltiplas, uma vez atingidas as condições de estado estacionário. O V_{ss} é definido pela **equação 6**:

(Eq. 6)

$$V_{ss} = \frac{Dose_{iv} \times ASMC}{(ASC)^2} = Cl \times MRT$$

Onde ASMC é a área sob o momento da curva, Cl é o *clearance* plasmático e MRT é o tempo de residência médio do fármaco no organismo.

Para os fármacos, cuja distribuição ocorre imediatamente, situação característica ao modelo monocompartimental, os três V_d terão valores similares. Já os fármacos que se distribuem para mais de um compartimento, geralmente os V_d seguem a ordem $V_{\text{área}} > V_{ss} > V_c$ (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004c; MARTINS, 2018). Então, calcular os valores dos diferentes volumes de distribuição pode auxiliar na avaliação da existência de diferentes velocidades de distribuição nos compartimentos do organismo (TOUTAIN; BOUSQUET-MELÓU, 2004c).

A eliminação é o processo de remoção irreversível de um fármaco ou de seus metabólitos do organismo, regido predominantemente pelos processos de metabolismo e excreção. Metabolismo ou biotransformação é o processo de conversão do fármaco em metabólitos mais solúveis para excreção biliar ou renal. O principal órgão metabolizador é o fígado, contudo o metabolismo também pode ocorrer nos pulmões, rins, TGI e até mesmo no sangue. As reações metabólicas são catalisadas por sistemas enzimáticos, responsáveis pelos processos bioquímicos classificados como reações de fase I e fase II. As reações de fase I envolvem a transformação da estrutura molecular pela introdução ou modificação de um grupo funcional, através de reações de oxidação, redução, carboxilação ou hidrólise,

catalisadas pelas enzimas do citocromo P450. As reações de fase II são responsáveis pela conjugação dos metabólitos de resultantes da fase I com ácido glucurônico, sulfato, ou aminoácidos através de enzimas conhecidas como transferases (BOROUJERDI, 1995; FAN et al., 2014; MARTINS, 2018). Por outro lado, a excreção representa a eliminação do fármaco inalterado ou de seus metabólitos. As principais rotas de excreção são pela via renal e biliar, mas também pode ocorrer pela saliva, leite e ar exalado (BOROUJERDI, 1995; TOZER et al., 2009; MARTINS, 2018). A excreção renal geralmente envolve um ou mais dos três processos distintos: filtração glomerular, secreção e reabsorção tubular renal. A excreção biliar é um processo facilitado pelo sistema de transporte ativo localizados na membrana canalicular do hepatócito, sendo um importante caminho de eliminação hepática para muitos compostos (FAN et al., 2014; MARTINS, 2018).

Um dos parâmetros farmacocinéticos relacionado à eliminação é o CI, que reflete a capacidade do organismo em eliminar o fármaco ou de um único órgão em eliminar o fármaco (por exemplo, $Cl_{hepático}$ e Cl_{renal}). O CI é definido como volume de plasma do qual o fármaco é eliminado por unidade de tempo e a somatória do CI de todos os órgãos eliminadores corresponde ao *clearance* total (Cl_{Total}), representado pela **equação 7** (BOROUJERDI, 1995; TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004; FAN et al., 2014):

(Eq. 7)

$$Cl_{Total} = Cl_{hepático} + Cl_{renal} + Cl_{outros}$$

A estimativa de Cl_{Total} pode ser feita através de uma via que seja experimentalmente mensurável, como por exemplo fezes e urina, e em que o fármaco seja totalmente eliminado. O Cl_{Total} também pode ser obtido através da **equação 8**:

(Eq. 8)

$$Cl_{Total} = \frac{Dose \times F}{ASC_{0-INF}}$$

O CI pode ser alterado em indivíduos com insuficiência hepática e/ou renal, promovendo mudanças significativas também no parâmetro meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$). Dessa maneira, é necessário que haja ajuste de dose para fármacos com estreita margem terapêutica e, em casos de fármacos nefrotóxicos ou hepatotóxicos, o monitoramento de marcadores renais e hepáticos (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a; MARTINS, 2018). Por isso, é considerado o parâmetro farmacocinético mais

importante, pois é o único parâmetro que controla a exposição geral ao fármaco (para uma determinada biodisponibilidade) e é um dos determinantes que permite o cálculo da dosagem necessária para manter uma concentração plasmática média em estado estacionário (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a).

A $t_{1/2}$ de eliminação é o tempo necessário para que a concentração plasmática decaia pela metade após alcançar o pseudoequilíbrio. Clinicamente, a $t_{1/2}$ de eliminação é útil, principalmente, para selecionar o intervalo apropriado do regime de posológico, já que controla o grau de acúmulo do medicamento e as flutuações da concentração. Além disso, é possível calcular o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio em um regime de doses múltiplas (5 meias-vidas) e o tempo necessário para atingir o *wash out* (10 meias-vidas) (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004b).

Quando o processo de absorção não é um fator limitante, a $t_{1/2}$ de eliminação é considerada um parâmetro híbrido, controlado Cl e V_d , como está demonstrado na **equação 9**:

(Eq. 9)

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2 \times V_d}{Cl}$$

Quando o processo de absorção é um fator limitante, a $t_{1/2}$ reflete a taxa e extensão da absorção e não o processo de eliminação (farmacocinética *flip-flop*) (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004b).

A $t_{1/2}$ de eliminação também pode ser definida pela **equação 10**:

(Eq. 10)

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda}$$

Onde 0,693 é o logaritmo natural de 2 e λ é a inclinação da reta terminal que caracteriza a velocidade com que ocorrem os processos de eliminação do fármaco (biotransformação e excreção). Em modelos monocompartimentais, λ geralmente é denominado como K_{el} e, em modelos bicompartimentais, como β (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004b).

Os parâmetros de tempo médio como o tempo de trânsito médio (MTT) e o MRT permitem observar o tempo de permanência do fármaco no organismo e também

são dependentes de Cl e V_d . O MTT expressa o tempo médio de movimento das moléculas de fármaco (na forma inalterada) no organismo desde o início da sua administração, incluindo a absorção. Já o MRT expressa o tempo médio de movimento das moléculas de fármaco (na forma inalterada) no organismo após a absorção (MRT). Nos casos em que o processo de absorção é inexistente, como na administração intravenosa ou intrarterial, o MTT é igual ao MRT (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004b; TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004d; MARTINS, 2018).

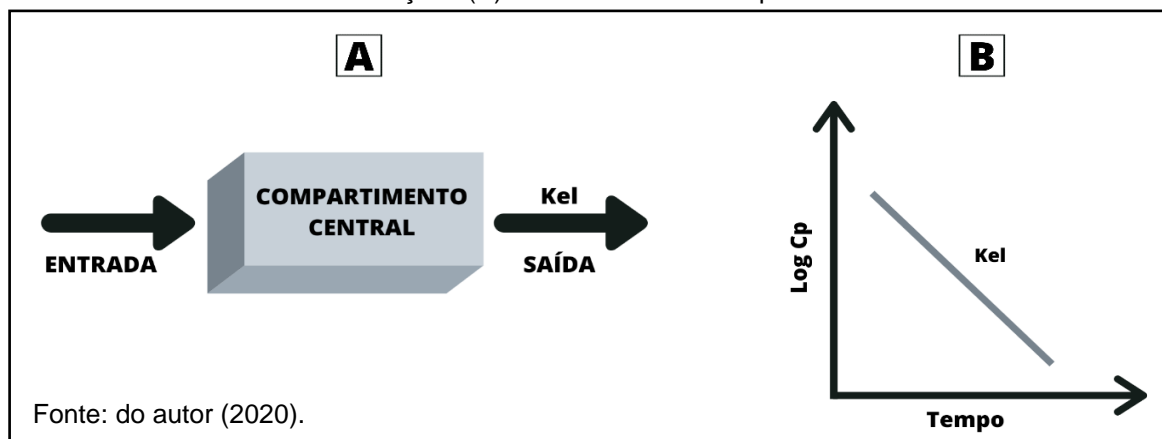
2.1.1.2 Análise Compartmental

A estimativa dos parâmetros de PK a partir do perfil de concentração plasmática *versus* tempo pode ser feita através da análise compartmental (FAN et al., 2014). Na análise compartmental, o organismo é representado por um ou mais compartimentos que o representam no ponto de vista cinético, mas não possuem significado anatômico ou fisiológico. Os compartimentos representam uma combinação de vários tecidos e órgãos que estão em rápido equilíbrio uns com os outros no que diz respeito às concentrações do fármaco. Os compostos podem apresentar perfis de concentração plasmática *versus* tempo monocompartmental (compartimento único) ou multicompartimentais (dois ou mais compartimentos). A determinação do modelo compartmental que melhor se ajusta à disposição cinética do fármaco é feita pela análise do perfil de concentração plasmática *versus* tempo obtido através da transformação dos valores de concentração plasmática em logaritmo ("log") e sua plotagem *versus* tempo (STORPIRTIS et al., 2011).

O modelo monocompartmental é o mais simples e assume que o fármaco é distribuído de forma homogênea e instantânea por todos os líquidos e tecidos do organismo, considerado um compartimento único. Contudo, apesar da distribuição ser homogênea, não significa que a concentração é a mesma em todos os tecidos, e sim que as diferentes concentrações estão em equilíbrio (STORPIRTIS et al., 2011; FAN et al., 2014). Portanto, como o processo de distribuição é imediato, o único processo que rege o decaimento das concentrações é a eliminação, existindo apenas uma velocidade de decaimento que caracteriza a constante de eliminação, denominada K_{el} . Na **figura 1.A**, está representado o esquema do modelo monocompartmental, caracterizado pelos processos de entrada, distribuição (instantânea) e saída (eliminação), e na **figura 1.B**, está representado o perfil de "log" da concentração do

fármaco versus tempo apresentado por uma única reta de decaimento das concentrações (DHILLON et al., 2006).

Figura 1 - Representação esquemática (A) e representação gráfica do decaimento das concentrações (B) no modelo monocompartimental.

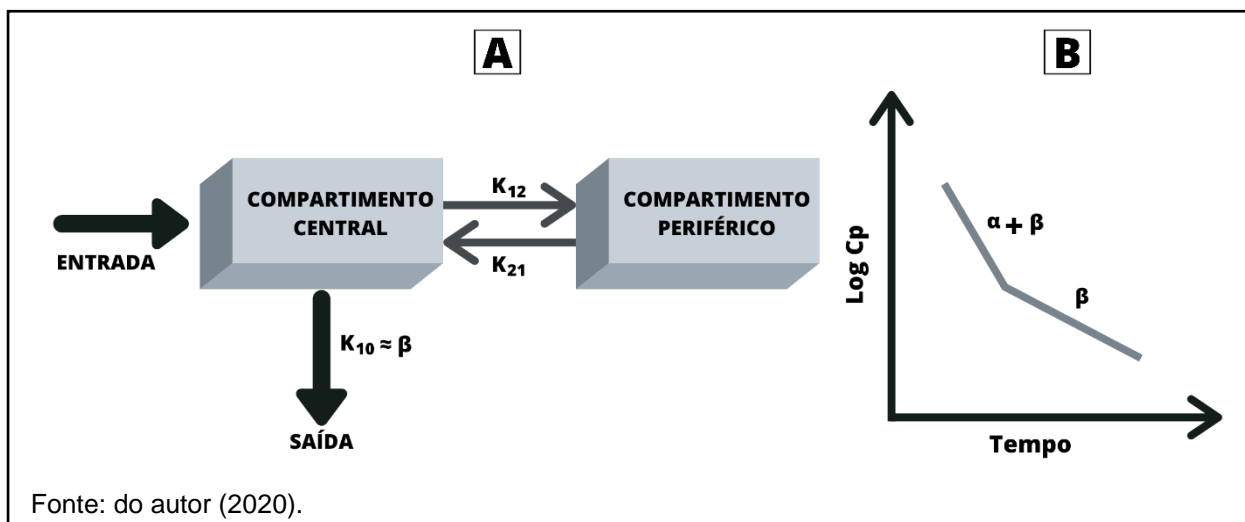


Os modelos multicompartimentais são os mais adequados para interpretar o comportamento de muitos fármacos no organismo. O modelo mais utilizado é o bicompartimental (dois compartimentos), seguido dos modelos tricompartmentais (três compartimentos), que já se tornam muito complexos (BOROUJERDI, 1995; STORPIRTIS et al., 2011; FAN et al., 2014; MARTINS, 2018).

O modelo bicompartimental considera o organismo como a soma de um compartimento central e um compartimento periférico. Os compartimentos são conjuntos de tecidos diferentes que possuem graus de afinidade diferentes dependendo das características do fármaco e da perfusão de sangue do órgão. Embora esses compartimentos não sejam um conjunto fixo de tecidos e não possuam significado fisiológico ou anatômico, é assumido que o compartimento central compreende o sangue e os tecidos com alta perfusão sanguínea como coração, pulmões, rins, fígado e cérebro. O compartimento periférico compreende tecidos com menor perfusão sanguínea, como gordura, músculo e pele (DHILLON et al, 2006; STORPIRTIS et al., 2011; MARTINS, 2018). Como a distribuição do fármaco é mais rápida no compartimento central do que no periférico, existem duas velocidades de decaimento das concentrações que caracterizam constantes de eliminação diferentes: constante de distribuição α (composta pelas microconstantes K_{12} e K_{21}), que representa a fase de distribuição, e constante de eliminação β , que representa a fase de eliminação do fármaco. Na **figura 2.A**, está representado o esquema do modelo bicompartimental, caracterizado pelos processos de entrada, distribuição central,

distribuição periférica e saída (eliminação) e na **figura 2.B**, está representado o perfil de “log” da concentração do fármaco versus tempo apresentado por duas retas de decaimento das concentrações (DHILLON et al., 2006).

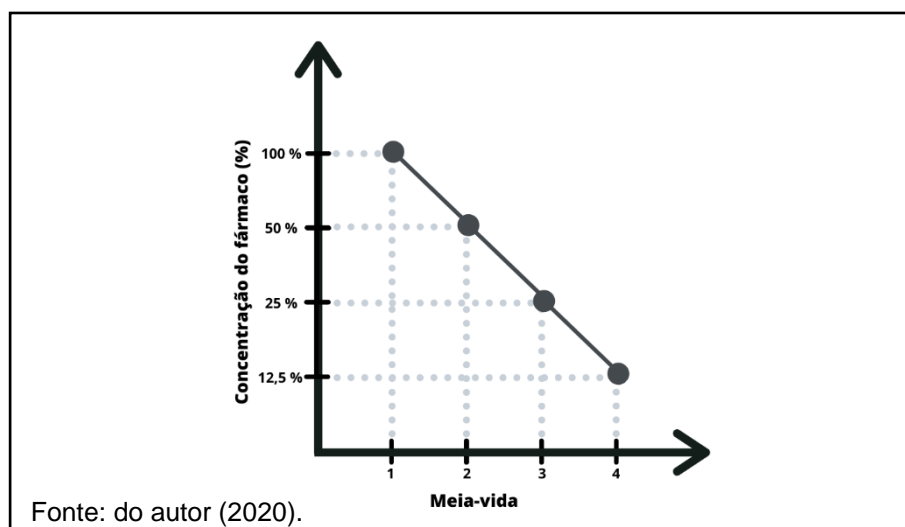
Figura 2 - Representação esquemática (A) e representação gráfica do decaimento das concentrações (B) no modelo bicompartimental.



2.1.1.3 Ordem cinética

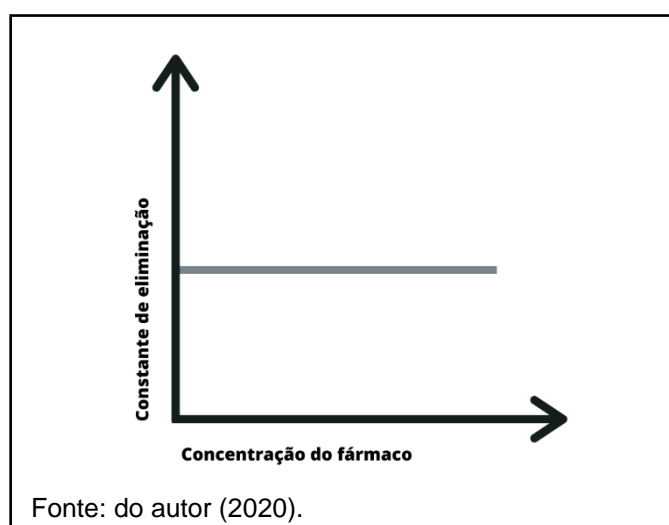
A ordem cinética é o modo pelo qual a concentração do fármaco se relaciona com a velocidade envolvida no seu processo de transferência através dos processos fisiológicos. Os processos fisiológicos ADME seguem uma cinética de transferência do fármaco através do organismo, caracterizada por meio de constantes de velocidade relacionadas a uma determinada ordem cinética (primeira ordem ou ordem zero) (TANG-LIU et al., 1982; STORPIRTIS et al., 2011; MARTINS, 2018). Na cinética de primeira ordem, a velocidade dos processos é diretamente proporcional às concentrações plasmáticas e os processos não são saturáveis. Dessa forma, a ASC é diretamente proporcional à dose administrada e a concentração do fármaco diminui de forma previsível de acordo com os intervalos de tempo determinado. Além disso, a alteração de dose não implica em modificações nos valores de meia-vida de eliminação, Cl ou V_d . A cinética de primeira ordem apresenta uma relação linear de concentração do fármaco versus tempo (**figura 3**), sendo a cinética de eliminação da maioria fármacos usualmente utilizados na terapêutica (TANG-LIU et al., 1982; STORPIRTIS et al., 2011; MARTINS, 2018).

Figura 3 - Relação da concentração do fármaco (%) versus tempo (meia-vida) na cinética de primeira ordem de eliminação.



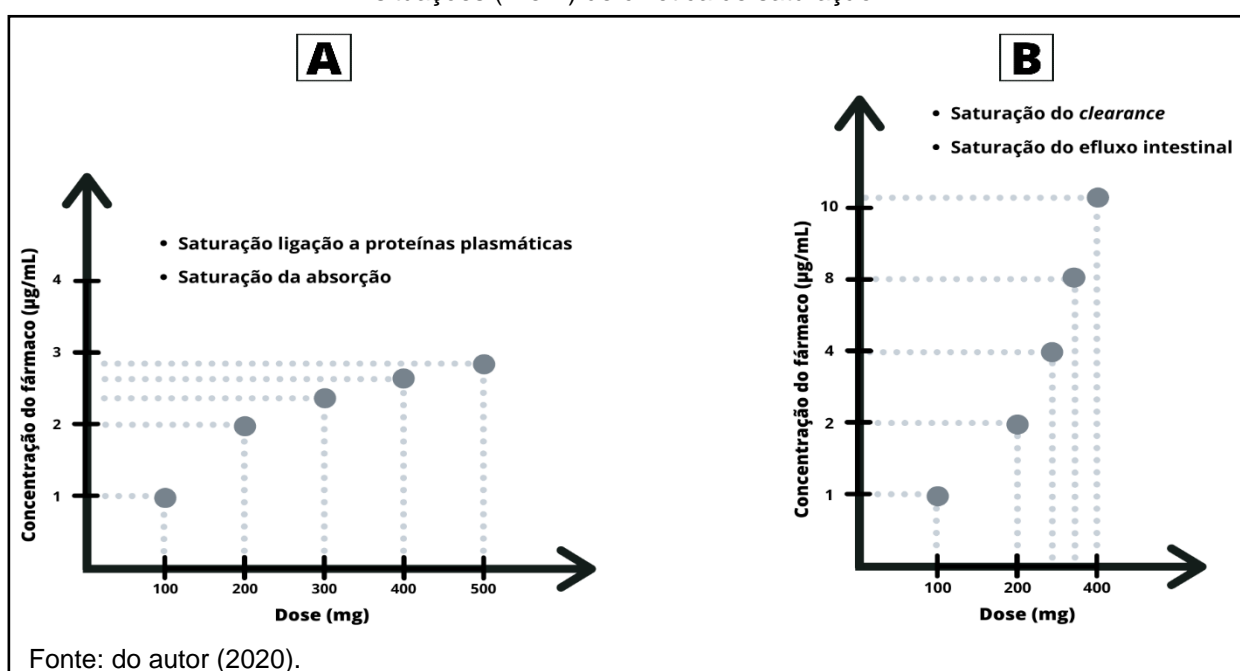
Na cinética de ordem zero, a velocidade do processo é constante e independente da concentração do fármaco, de forma que os processos de eliminação do organismo que podem ser saturados. Nesses casos, a relação de concentração do fármaco versus constante de eliminação é representada por uma linha reta, sendo descrita como cinética não linear (**figura 4**). Diversos fatores podem possibilitar a cinética não linear como baixa solubilidade do fármaco, alterações no esvaziamento gástrico bem como a saturação de processos enzimáticos (cinética de Michaelis-Menten) envolvidos nos processos ADME (TANG-LIU et al., 1982; STORPIRTIS et al., 2011; MARTINS, 2018).

Figura 4 - Relação da concentração plasmática do fármaco e da constante de eliminação na cinética de ordem zero.



Alguns fármacos podem apresentar uma cinética linear até determinado ponto em que as enzimas saturam e o aumento das concentrações do fármaco não é mais proporcional. Essa mudança de cinética de primeira ordem para cinética de ordem zero é conhecida como cinética de saturação e a representação gráfica do perfil de concentração versus tempo depende de quais processos foram saturados, conforme mostra a **figura 5** (TANG-LIU et al., 1982; BOROUEJERDI, 1995; STORPIRTIS et al., 2011).

Figura 5 - Relação da concentração plasmática ($\mu\text{g/mL}$) e dose (mg) em diferentes situações (A e B) de cinética de saturação.



2.1.2 Farmacodinâmica

2.1.2.1 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA)

A farmacodinâmica (PD) estabelece a relação entre a concentração do fármaco e os seus efeitos, que podem ser benéficos (terapêuticos) ou maléficos (adversos). Os parâmetros farmacodinâmicos podem ser determinados *in vivo* ou *in vitro*. No caso dos antimicrobianos, é mais comum a realização de estudos *in vitro*, através dos TSA, que incluem a determinação da CIM e da concentração bactericida mínima (CBM) (LODE et al., 1998; ANDREWS, 2001; LUO et al., 2019).

A CIM representa a menor concentração de um antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo depois de incubação e é considerada o “padrão ouro” para a determinação da sensibilidade de microrganismos aos

antimicrobianos (ANDREWS, 2001; CLSI, 2018a). Pode ser expressa como CIM₅₀ (menor concentração antimicrobiana que inibe o crescimento de 50% das cepas de uma determinada espécie bacteriana) ou como CIM₉₀ (menor concentração antimicrobiana que inibe o crescimento de 90% das cepas de uma determinada espécie bacteriana) (CLSI, 2018a; ROBERTS; BIOMÉRIEUX, 2018). A unidade de medida para CIM é em µg/mL.

Os testes de CIM são categorizados por várias agências internacionais. Um dos principais manuais adotados como referência é o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), que se baseia em propriedades de PK-PD e mecanismos de resistência. Uma das metodologias descritas como padrão de referência no documento M07 do CLSI – Métodos para teste de sensibilidade aos antimicrobianos por diluição para bactérias que crescem aerobicamente – é o teste de microdiluição em caldo, que é suficientemente prático e merece o uso rotineiro, tanto nos laboratórios clínicos, como nos laboratórios de pesquisa (CLSI, 2018a).

O método de microdiluição em caldo é aceito para medir qualitativamente e quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra bactérias aeróbicas ou facultativas comumente isoladas que crescem satisfatoriamente após incubação de um dia para outro em meio Mueller-Hinton sem suplementação. Para realizar o teste, preparam-se microplacas com meio caldo, as quais são acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. A seguir, as microplacas são inoculadas com uma suspensão padrão do microrganismo a ser testado. Após incubação de 24 horas, é feita a leitura dos testes e a determinação da CIM (CLSI, 2018a).

Já a CBM demonstra a menor concentração de agente antimicrobiano que resulta em morte microbiana. A determinação de CBM é complementar ao CIM, além de ser uma ferramenta boa e relativamente barata (ANDREWS, 2001). Para a determinação de CBM, a norma M26-A – Métodos para Determinação da Atividade Bactericida de Agentes Antimicrobianos – do CLSI é um padrão aceito. O teste de CBM é realizado a partir da mistura de cada poço da microplaca replicada em placa de ágar e, após incubação de um dia para o outro, as placas são analisadas para o crescimento ou não das bactérias (CLSI, 1999).

2.1.2.2 Interpretação do TSA

A CIM é usada para determinar a sensibilidade *in vitro* de um patógeno a uma possível terapia antimicrobiana. Os valores de CIM dependem do método usado, do tipo de antimicrobiano, da espécie microbiana e do isolado (ROBERTS; BIOMÉRIEUX, 2018).

O valor de CIM permite que o clínico selecione o antimicrobiano mais apropriado e personalize a dosagem antimicrobiana levando em consideração a sensibilidade do patógeno (CIM) combinada com o perfil do paciente e os parâmetros farmacocinéticos do fármaco por meio da monitorização terapêutica (ROBERTS; BIOMÉRIEUX, 2018).

O objetivo do TSA é prever o provável sucesso ou falha do tratamento de uma terapia escolhida e ajudar na luta para diminuir a resistência aos antibióticos (ROBERTS; BIOMÉRIEUX, 2018).

Os resultados dos TSA são interpretados com base em padrões interpretativos denominados como pontos de corte clínicos, utilizados para predizer a resposta clínica no paciente infectado (EUCAST, 2019). Os pontos de corte são as concentrações de um antimicrobiano que define se uma espécie bacteriana é sensível ou resistente a um determinado antimicrobiano e são estabelecidos pelo CLSI e pela *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) para cada antibiótico, conforme listado nas versões atuais dos documentos. No Brasil, a Portaria nº 64 do Ministério da Saúde de 2018 tornou compulsório o uso das normas do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST), comitê brasileiro reconhecido oficialmente pelo EUCAST, em todos os laboratórios clínicos no Brasil.

De acordo com a versão 9.0 de 2019 do documento da EUCAST, os pontos de corte de sensibilidade são divididos em três categorias interpretativas: “S” (Sensível, dose padrão), “I” (Sensível, aumentando exposição) e “R” (Resistente). Um microrganismo é categorizado como “S” quando existe uma alta probabilidade de sucesso terapêutico utilizando o regime de dose padrão do agente, como “I” quando existe uma alta probabilidade de sucesso terapêutico devido ao aumento da exposição ajustando-se o regime de dosagem ou sua concentração no local de infecção e, por fim, como “R” quando existe uma alta probabilidade de falha terapêutica mesmo quando há aumento da exposição (EUCAST, 2019).

A comparação de CIM de diferentes antimicrobianos não se baseia apenas no valor numérico, mas em quão longe a CIM está do ponto de corte clínico. Além disso, fatores como local da infecção, idade, espécie, saúde do paciente, possíveis efeitos adversos do medicamento, frequência e via de administração também são importantes para a seleção (IDDEX, 2019).

2.1.3 Modelo Farmacocinético-Farmacodinâmico (PK-PD)

A resistência a medicamentos antimicrobianos é um problema de saúde pública que desafia os médicos a oferecerem tratamentos eficazes sem disseminar resistência a outras pessoas, animais e meio ambiente (PAPICH, 2014; LOU et al., 2019). A exposição inadequada aos antimicrobianos durante o tratamento é um dos fatores que mais contribuem para o surgimento de resistência. O uso adequado desse grupo farmacológico é imprescindível para melhorar a situação preocupante de resistência bacteriana que se apresenta no cenário mundial (FEDERICO et al., 2015; LOU et al., 2019).

A antibioticoterapia racional requer regimes posológicos otimizados, não apenas para garantir a eficácia clínica, mas também para minimizar a seleção e disseminação de patógenos. Uma das estratégias na medicina, inclusive na medicina veterinária, é a aplicação do modelo PK-PD, que tem sido amplamente usado para estabelecer regimes de dosagem racionais para agentes antimicrobianos, podendo alcançar prevenção e tratamento eficazes de doenças bacterianas e evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana (LUO et al., 2020).

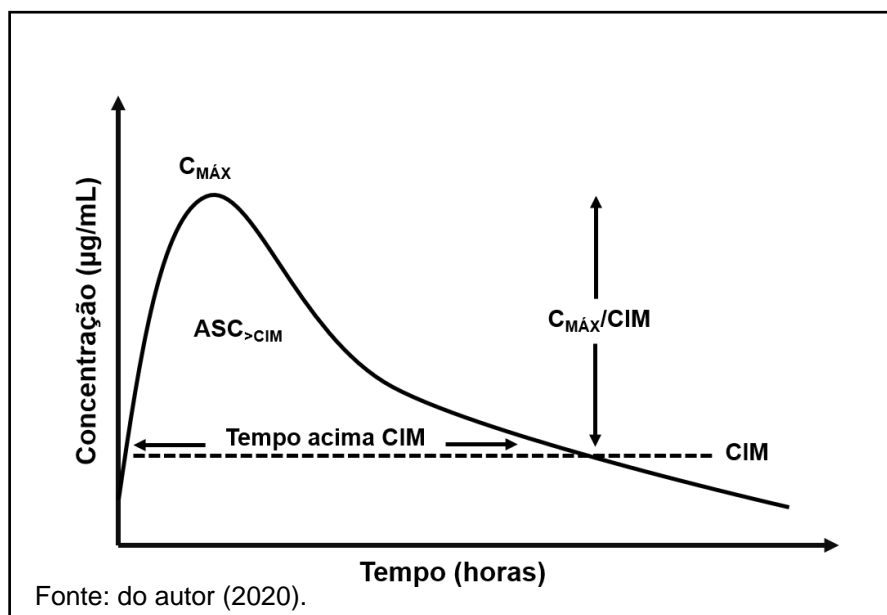
O modelo PK-PD inclui principalmente três abordagens: PK-PD *in vitro*, *in vivo* e *in ex vivo*. Para avaliar as interações entre o fármaco e a bactéria, foi combinado as características do modelo de PK-PD *in vitro* e *in vivo*, uma vez que correlaciona as concentrações plasmáticas e os parâmetros farmacocinéticos obtidos durante a exposição aos antimicrobianos *in vivo* com a sensibilidade microbiana aos antibióticos *in vitro* através da CIM₅₀ ou CIM₉₀ (ALIABADI; LEES, 2000; PAPICH, 2014; LUO et al., 2020).

Através do modelo PK-PD, é possível realizar a determinação de índices numéricos de predição de eficácia do antimicrobiano contra o patógeno-alvo, permitindo prever o sucesso ou fracasso da terapia (ALIABADI; LEES, 2000). Na **figura 6**, estão representados os principais índices PK-PD usados para prever a eficácia de um antimicrobiano: (i) razão entre ASC e CIM (ASC/CIM), (ii) área sob a

curva inibitória (ASCI), (iii) razão entre $C_{MÁX}$ e CIM ($C_{MÁX}/CIM$) e (iv) a porcentagem de tempo em que a concentração plasmática excede o CIM ($T>CIM$) (TOUTAIN et al. 2002; PAPICH, 2014). Os três primeiros índices são relacionados a antibióticos concentração-dependentes, e o quarto a antibióticos tempo-dependentes (TOUTAIN et al., 2002; PAPICH, 2014; YU et al., 2016).

Como a maioria dos patógenos de interesse clínico está localizada extracelularmente e a biofase para os antibióticos é o líquido extracelular, é importante que a ligação a proteínas plasmáticas dos antibióticos seja observada, pois a concentração livre do fármaco no local de ação pode ser discrepante da concentração plasmática, se o fármaco tiver uma alta taxa de ligação a proteínas. Nesses casos, a fração livre do fármaco no plasma (f_u) deve ser considerada para obtenção dos índices PK-PD para construção do regime posológico (TOUTAIN et al., 2002), sendo nomeados da seguinte forma: razão entre ASC do fármaco livre e CIM (f_{ASC}/CIM), razão entre $C_{MÁX}$ de fármaco livre e CIM ($fC_{MÁX}/CIM$) e a porcentagem de tempo em que a concentração do fármaco livre excede o CIM ($fT>CIM$).

Figura 6 - Índices PK-PD.



2.1.3.1 ASC/CIM e ASCI

O índice ASC/CIM representa a razão entre a ASC total para um período de 24 horas e o CIM. O intervalo de 24 horas deve estar no estado estacionário idealmente, porém muitos estudos veterinários são limitados a uma dose única. Se ASC do tempo zero ao infinito ($ASC_{0-\infty}$) após uma dose única for equivalente à ASC durante um

intervalo de dose (τ) no estado estacionário ($AUC_{0-\tau}$), pode ser usado se o intervalo de dose for de 24h. O termo pode ser escrito também como ASC_{24}/CIM , mas se não for, o intervalo de 24 horas está implícito (PAPICH, 2014).

Alguns autores usam o termo ASCI como sinônimo de ASC/CIM . Entretanto, existem algumas interpretações diferentes de ASCI. Neste trabalho, o índice ASCI é considerado como a ASC parcial para o período de tempo durante o qual as concentrações estão acima da CIM dividida pelo CIM . ASCI também deve ser calculado no estado estacionário, no período de 24 horas (DALLA COSTA et al., 1996; TOUTAIN et al., 2002).

Apesar de, muitas vezes, os números desses índices serem reportados de forma adimensional (por exemplo, 125), eles possuem uma dimensão temporal em horas. Ao dizer, por exemplo, que ASC/CIM deve ser de 125 horas para otimizar a eficácia, na prática, equivale a dizer que a concentração média no plasma durante um intervalo de administração de 24 horas deve ser cerca de cinco vezes a CIM ($125/24h$).

2.1.3.2 $C_{MÁX}/CIM$

O índice $C_{MÁX}/CIM$ é expressado como a razão entre $C_{MÁX}$ e CIM , portanto, não possui unidade. $C_{MÁX}$ é um parâmetro híbrido, que depende da dose e é influenciado pelo *clearance*, biodisponibilidade e pelas constantes de absorção e eliminação. Devido a isso, $C_{MÁX}/CIM$ reflete melhor que ASC/CIM o acúmulo de concentração inicial no plasma, o que pode ser relevante se for desejável uma rápida obtenção de uma alta concentração para otimizar a eficácia do medicamento e minimizar o surgimento de resistência (PAPICH, 2014).

2.1.3.3 $T>CIM$

O índice $T>CIM$ corresponde porcentagem de tempo durante um intervalo de 24 horas em que a concentração está acima do CIM e é obtido por simples inspeção da curva. O $T>CIM$ é influenciado pela meia-vida terminal, que é um parâmetro híbrido que envolve a depuração plasmática, a distribuição nos tecidos e fluidos corporais e a constante de absorção (para formulações de liberação prolongada em processo de flip-flop).

Esse índice é um bom preditor de eficácia para antibióticos tempo-dependentes, sendo um limitante na seleção do intervalo de administrações do antibiótico para a construção do regime posológico (DALLA COSTA, 1996; BOUSQUET-MELOU et al., 2002). Em geral, é recomendado que o $T > MIC$ dos

antimicrobianos seja pelo menos de 50% e preferencialmente maior ou igual a 80% do intervalo de dosagem para obter um efeito bactericida ideal (TOUTAIN et al., 2002; PAPICH, 2014).

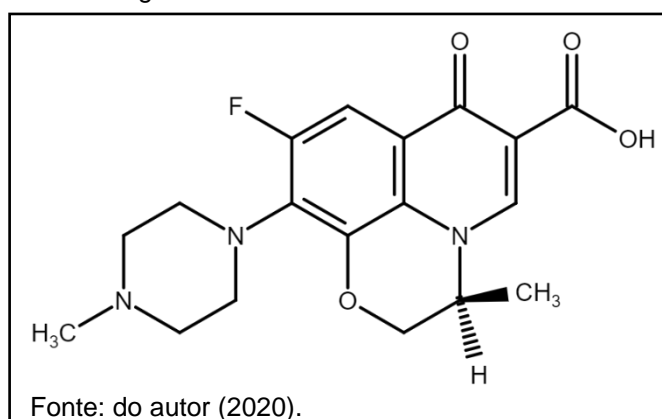
2.2 Levofloxacin

O LEV é um antibiótico fluoroquinolona de terceira geração com amplo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de outros patógenos como *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Legionella* e *Mycobacteria* spp.

2.2.1 Características físico-químicas

O LEV (**figura 7**), uma carboxiquinolona quiral fluorada, é o S-enantiômero puro da mistura racêmica de ofloxacina. É tão ativa quanto o racemato, mas é até cento e vinte e oito vezes mais ativa que o isômero R-ofloxacina.

Figura 7 - Estrutura molecular do LEV.



Seu nome químico é (-)-(S)-9-flúor-2,3-diidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo-7H-pirido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazina-6-ácido carboxílico, cuja fórmula molecular é $C_{18}H_{20}FN_3O_4$ e com massa molecular de 361,37 g/mol. O fármaco apresenta-se como um pó cristalino branco-amarelado e é livremente solúvel em ácido acético glacial e clorofórmio (FISH; CHOW, 1997). Sua solubilidade aquosa a 25°C é de 16,98 mg/ml e pode variar de acordo com alterações na temperatura e pH do tampão, aumentando em temperaturas mais altas e em pH ácido (BLOKHINA et al., 2016).

A constante de dissociação ácida (pK_a) da molécula foi determinada por estudos de solubilidade em função do pH e espectrofotometria, apresentando um valor de 5,7 (ácido carboxílico) e 8,0 (anel piperazinil) (BLOKHINA et al., 2016). O valor de coeficiente de partição (Log P), determinado por Blokhina et al. (2016) através do método shake-flask água/n-octanol, é de -0,25. Os estudos de permeabilidade em

monocamada de fosfolípídeos artificiais apresentam um coeficiente de permeabilidade aparente de $6.3 \pm 0.28 \times 10^7 \text{cm.s}^{-1}$ em pH 2 e de $2.6 \pm 0.05 \times 10^7 \text{cm.s}^{-1}$ em pH 7,4 (BLOKHINA et al., 2016).

2.2.2 Indicação terapêutica e posologia

Em humanos, o LEV é indicado no tratamento de uma variedade de infecções bacterianas, tais como: infecções do trato respiratório superior e inferior, incluindo sinusite, exacerbações agudas de bronquite crônica e pneumonia; infecções da pele e tecido subcutâneo complicadas e não complicadas, tais como impetigo, abscessos, furunculose, celulite e erisipela; infecções do trato urinário, incluindo pielonefrite; e osteomielite (HURST et al., 2002; CROOM; GOA, 2003).

O LEV está disponível nas formas oral e intravenosa. As diretrizes para o uso do LEV variam de acordo com o país; nos Brasil, recomenda-se LEV oral e/ou intravenosa 500 mg uma vez ao dia para o tratamento de pacientes, com função renal normal, em casos de exacerbações agudas de bronquite crônica (7 dias), pneumonia (7 a 14 dias), sinusite aguda (10 a 14 dias) e infecção não complicada de pele e tecido subcutâneo (7 a 10 dias). Em pacientes com infecção complicada de pele e tecido subcutâneo, recomenda-se um tratamento de 7 a 14 dias com LEV 750 mg por via intravenosa ou oral uma vez ao dia. Recomenda-se a administração de LEV 250 mg por via intravenosa ou oral uma vez ao dia para pacientes com infecções do trato urinário não complicadas ou complicadas (por 3 e 10 dias, respectivamente) (GRABE et al., 2010; GAIOLLA et al., 2015; PILTCHER et al., 2018).

2.2.3 Efeitos adversos

A maioria dos eventos adversos relacionados ao LEV são tipicamente transitórios e de gravidade leve a moderada. Os efeitos adversos mais comuns são náusea, diarreia, vaginite, prurido, dor abdominal, tontura, flatulência e erupção cutânea. Assim como as outras fluoroquinolonas, o LEV está associado a um risco aumentado de tendinite e ruptura de tendão em todas as idades. O LEV tem potencial moderado a grave para reações de fotossensibilidade/fototoxicidade. Outros eventos adversos raros documentados durante a terapia com LEV incluem colite pseudomembranosa, anemia hemolítica, neuropatia periférica e prolongamento do intervalo QT (HURST et al., 2002; FDA, 2008).

2.2.4 Mecanismo de ação, efeito pós-antimicrobiano (EPA) e resistência

O mecanismo de ação do LEV e de outros antimicrobianos fluoroquinolonas envolve a inibição da topoisomerase bacteriana IV e da DNA girase (ambas as topoisomerasas tipo II), enzimas necessárias para replicação, transcrição, reparo e recombinação do DNA. A DNA girase é considerada o principal local de ação das fluoroquinolonas em muitas bactérias (HOOPER, 1999).

Assim como em outras fluoroquinolonas, a ocorrência moderada do fenômeno conhecido como efeito pós-antimicrobiano (EPA) tem sido relatada para o LEV. O EPA é definido como a persistência da atividade inibitória de um antimicrobiano sobre um determinado microrganismo por um período de tempo após a concentração plasmática do fármaco estar abaixo da CIM. Em geral, a ocorrência do EPA está relacionada aos antimicrobianos cujo mecanismo de ação envolve a síntese proteica ou com a inibição da síntese de DNA ou RNA. O EPA pode ser resultante da ação de concentrações muito abaixo da CIM (concentrações sub-inibitórias) do antimicrobiano para o patógeno em avaliação que, apesar de não serem possíveis de quantificar, são capazes de alterar a morfologia bacteriana e reduzir sua taxa de crescimento. A duração do EPA depende de diversos fatores como patógeno, antimicrobiano avaliado, concentração plasmática, duração da exposição, etc. Também tem sido observado que o EPA aumenta a ação dos leucócitos após o uso do antimicrobiano por tornar os microrganismos mais susceptíveis à atividade antibacteriana dos leucócitos humanos. (CRAIG, 1993; BUFFE et al., 2001).

A resistência às fluoroquinolonas pode surgir através de mutações em regiões definidas da DNA girase ou topoisomerase IV, denominadas regiões determinantes da resistência à quinolona (QRDRs) ou através de efluxo alterado. Contudo, estudos de resistência sugerem que a topoisomerase IV é o principal alvo das bactérias Gram-positivas como *S. pneumoniae* (FUKUDA; HIRAMATSU, 1999; MORRISSEY; GEORGE, 2000).

2.2.5 Farmacocinética do LEV em humanos

Em humanos, o LEV é absorvido rapidamente e completamente após administração oral. As condições de estado estacionário são atingidas dentro de 48 horas após um regime de dosagem de 500 mg ou 750 mg uma vez ao dia. No estado estacionário, a concentração plasmática máxima ($C_{MÁX}$) e concentração plasmática mínima ($C_{MÍN}$) após a administração intravenosa de 500 mg de LEV uma vez ao dia

foram de 6,4 mg/L e 0,58 mg/L, respectivamente. O tempo para atingir a $C_{MÁX}$ ($T_{MÁX}$) ocorre geralmente 1-2 horas após a administração. A administração oral com alimentos prolonga a $T_{MÁX}$ em aproximadamente 1 hora e diminui ligeiramente a $C_{MÁX}$, mas essas alterações não são clinicamente significativas (CHIEN et al., 1997; FISH; CHOW, 1997).

Como a absorção oral do LEV é rápida e essencialmente completa, os perfis de concentração plasmática versus tempo após a administração do LEV por via oral ou intravenosa são muito semelhantes e são consideradas intercambiáveis. A biodisponibilidade absoluta é de aproximadamente 99% (CHIEN et al., 1997).

A farmacocinética do LEV é linear e previsível após regimes posológicos orais ou intravenosos de doses únicas ou múltiplas, obedecendo a cinética de primeira ordem (CHIEN et al., 1997; GOODWIN et al., 1994). Além disso, possui um perfil farmacocinético que permite a administração uma vez ao dia (CROOM; GOA, 2003).

A disposição do LEV é melhor descrita pelo modelo bicompartimental (GOODWIN et al., 1994; CHIEN et al., 1997). A extensa distribuição do LEV nos tecidos e fluidos resulta em um grande volume médio de distribuição (V_d) de 74 a 112 L após doses únicas e múltiplas de 500 mg ou 750 mg. Em muitos tecidos e fluidos corporais, as concentrações plasmáticas após administração oral são semelhantes ou consideravelmente superiores àquelas observadas no plasma (FISH; CHOW, 1997). A ligação do LEV às proteínas plasmáticas é de aproximadamente 24 a 38%. Sua ligação é principalmente à albumina sérica e é independente da concentração do medicamento (FISH; CHOW, 1997).

O LEV é estereoquimicamente estável no plasma e na urina e não se inverte metabolicamente no seu enantiômero D-ofloxacina. O metabolismo do LEV é limitado em humanos, sendo pouco relevante em sua atividade farmacológica. Cerca de 85% do fármaco é excretado pela urina na sua forma inalterada (CHILD et al., 1995; FISH; CHOW, 1997). A meia-vida de eliminação ($T_{1/2}$) do LEV é de 6 a 8 horas. O *clearance* aparente total do corpo (Cl_{total}) e *clearance* renal (Cl_{renal}) variam de aproximadamente 8,64 a 13,56 L/h e 5,76 a 8,52 L/h, respectivamente, indicando um pequeno grau de excreção não renal (DAVIS; BRYSON, 1994; FISH; CHOW, 1997).

2.2.6 Farmacocinética do LEV em animais

Em especial, o LEV tem sido uma ferramenta terapêutica interessante na medicina veterinária e é considerado um fármaco promissor para o tratamento para

várias infecções de tecidos moles (GOUDAH et al., 2008). Por isso, seu perfil farmacocinético tem sido investigado em muitas espécies animais, conforme está apresentado na **tabela 1**.

Tabela 1 - Farmacocinética do LEV em diversas espécies de animais.

Espécie	N	Dose (mg/kg)	Via de adm.	Parâmetros farmacocinéticos (média ± DP)										Autor
				α	$T_{1/2\alpha}$	β	$T_{1/2\beta}$	Cl	Vd	ASC _{0-inf}	F	C _{máx}	T _{máx}	
				K _a	T _{1/2} ab									
Gatos	5	10	iv	3,13 ± 4,99	0,26 ± 0,18	0,21 ± 0,13	9,31 ± 1,63	0,14 ± 0,04	1,75 ± 0,42	77,39 ± 21,87	-	-	-	Albarellos et al., 2005.
Gatos	5	10	iv	12,03 ± 9,71	0,16 ± 0,20	0,09 ± 0,04	8,37 ± 3,47	0,14 ± 0,04	1,57 ± 0,51	57,50 ± 29,67	71,20 ± 22,99	4,38 ± 1,52	1,18 ± 1,03	Albarellos et al., 2005.
Bezerros	5	4	iv	12,2 ± 1,13	0,059 ± 0,005	1,43 ± 0,14	1,61 ± 0,07	0,32 ± 0,05	0,74 ± 0,03	12,7 ± 0,20	-	-	-	Dumka; Srivastava, 2007.
Cavalos	6	4	iv	3,49 ± 0,62	0,21 ± 0,13	0,28 ± 0,21	2,58 ± 0,51	0,21 ± 0,18	0,81 ± 0,26	18,79 ± 4,57	-	-	-	Goudah et al., 2008.
Cavalos	6	4	im	1,93 ± 0,74	0,49 ± 0,26	0,25 ± 0,14	2,94 ± 0,78	-	-	17,21 ± 4,36	91,76 ± 12,68	2,85 ± 0,89	1,56 ± 0,71	Goudah et al., 2008.
Cabras	6	4	iv	2,1 ± 0,19	0,31 ± 0,11	0,24 ± 0,10	2,95 ± 0,27	0,18 ± 0,04	0,73 ± 0,22	23,94 ± 2,61	-	-	-	Goudah; Abo-El-Sooud, 2008.
Cabras	6	4	im	1,37 ± 0,18	0,54 ± 0,10	0,22 ± 0,02	3,64 ± 0,42	-	-	21,31 ± 1,24	84,91 ± 7,52	3,16 ± 0,46	1,78 ± 0,32	Goudah; Abo-El-Sooud, 2008.
Camelos	8	4	iv	2,87 ± 0,54	0,26 ± 0,21	0,27 ± 0,20	2,92 ± 0,61	0,28 ± 0,03	1,01 ± 0,36	14,51 ± 2,64	-	-	-	Goudah, 2009.
Camelos	8	4	im	1,63 ± 0,92	0,43 ± 0,23	0,23 ± 0,12	3,47 ± 0,86	-	-	13,63 ± 3,11	93,95 ± 8,38	1,90 ± 0,73	1,51 ± 0,61	Goudah, 2009.
Ovelhas	10	4	iv	2,19 ± 0,17	0,33 ± 0,12	0,19 ± 0,09	3,29 ± 0,23	0,20 ± 0,05	0,86 ± 0,23	21,61 ± 1,24	-	-	-	Goudah; Hasabelnaby, 2010.
Ovelhas	10	4	im	1,39 ± 0,15	0,51 ± 0,11	0,21 ± 0,04	3,58 ± 0,30	0,19 ± 0,03	1,02 ± 0,18	20,24 ± 1,31	91,35 ± 6,81	3,10 ± 0,35	1,64 ± 0,29	Goudah; Hasabelnaby, 2010.
Tartarugas	5	10	iv	-	-	0,15 ± 0,004	4,49 ± 0,12	0,23 ± 0,03	1,31 ± 0,04	43,15 ± 4,18	-	-	-	Aboubakr et al., 2014.
Tartarugas	5	10	im	-	1,02 ± 0,11	0,15 ± 0,01	4,60 ± 0,22	-	-	41,58 ± 3,86	96,45 ± 4,00	5,59 ± 0,26	2 ± 0,00	Aboubakr et al., 2014.

Tartarugas	5	10	vo	-	0,76 ± 0,13	0,17 ± 0,01	4,07 ± 0,17	-	-	34,40 ± 2,51	79,89 ± 2,74	5,15 ± 0,12	2 ± 0,00	Aboubakr et al., 2014.
Patos	6	10	iv	2,35 ± 0,19	0,30 ± 0,02	0,25 ± 0,01	2,76 ± 0,10	0,41 ± 0,04	1,37 ± 0,07	24,43 ± 2,46	-	-	-	Aboubakr; Soliman, 2014.
Patos	6	10	vo	3,31 ± 0,10	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,02	2,89 ± 0,09	-	-	17,97 ± 2,24	73,56 ± 2,38	3,63 ± 0,12	2,05 ± 0,08	Aboubakr; Soliman, 2014.
Cachorros	6	15	iv	2,09 ± 1,54	0,93 ± 1,29	0,11 ± 0,02	6,23 ± 0,91	0,14 ± 0,03	1,19 ± 0,20	107,9 ± 24,4	-	-	-	Madsen et al., 2020.
Coelhos	6	5	iv	-	-	0,34 ± 0,03	2,06 ± 0,18	0,60 ± 0,18	1,37 ± 0,39	9,08 ± 2,64	-	-	-	Sitovs et al.,2020.
Coelhos	6	5	im	-	-	0,34 ± 0,04	2,01 ± 0,24	-	-	9,07 ± 1,80	105,69 ± 27,50	3,33 ± 0,39	0,5	Sitovs et al., 2020.
Coelhos	6	5	sc	0,39 ± 0,03	1,80 ± 0,14	-	-	-	-	9,31 ± 1,50	118,93 ± 40,51	2,91 ± 0,56	0,75	Sitovs et al., 2020.

Fonte: do autor (2020).

2.2.7 Farmacodinâmica do LEV e seu uso na veterinária

Em geral, o LEV possui boa atividade *in vitro* contra bactérias Gram-positivas, negativas e outros microrganismos clinicamente relevantes. O LEV é ativo contra as cepas Gram-positivas e resistentes à penicilina de *Streptococcus pneumoniae*, as espécies Gram-negativas de *Enterobacter cloacae* e *Proteus mirabilis* e os microrganismos atípicos *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* e *Mycoplasma pneumoniae*, com CIM₉₀ de ≤ 2 µg/mL. O LEV é altamente ativo contra as espécies Gram-negativas de *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae* e *Moraxella catarrhalis* (CIM₉₀ de $\leq 0,06$ µg/mL), incluindo cepas positivas para β-lactamase de *H. influenzae* e *M. catarrhalis*. A atividade do LEV contra espécies Gram-positivas de *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina/oxacilina é levemente reduzida, com o CIM₉₀ (≤ 4 µg/mL) na faixa suscetível à faixa intermediária e a atividade do LEV contra a espécies Gram-negativas de *Escherichia coli* (CIM₉₀ $\leq 0,06$ a > 8 µg/mL) e *Pseudomonas aeruginosa* (CIM₉₀ de 0,5-64 µg/mL) é variável (CROOM; GOA, 2003; ANDERSON; PERRY, 2008; NOEL, 2009).

Com base em seu perfil farmacológico, há um interesse crescente no uso de fluoroquinolonas para tratamento de infecções bacterianas em equinos. A peritonite é uma das doenças abdominais mais importantes em equinos. Existem muitas causas conhecidas de peritonite, mas a maioria dos casos é secundária a doenças gastrointestinais e infecções mistas frequentemente predominam. Bactérias Gram-negativas são isoladas com mais frequência, especialmente bactérias da família Enterobacteriaceae, sendo a *E. coli*, o patógeno mais comumente cultivado. Dentre as bactérias Gram-positivas, espécies de *Streptococcus* e *Staphylococcus* também são frequentemente isoladas. As bactérias anaeróbias associadas a casos de peritonite incluem as espécies *Clostridium*, *Bacillus* e *Bacteroides*. Como a infecção é isolada dentro de uma cavidade corporal, antibióticos lipofílicos, como fluoroquinolonas, têm melhor penetração na área (DAVIS, 2003; ALONSO et al. 2020). Já em infecções de pele e respiratórias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus spp.* são isoladas comumente (BOUSQUET-MELOU et al., 2002).

2.2.8 Farmacocinética-Farmacodinâmica do LEV

Na medicina veterinária, os índices PK-PD ainda não foram validados, mas como as diferenças podem refletir somente variações de PK e CIM nas espécies, é

razoável assumir que os pontos de corte para obter eficácia serão semelhantes em diferentes espécies animais. Assim, os resultados obtidos em modelos de infecção animal ou em ensaios na clínica humana podem ser bons pontos de partida para projetar esquemas de dosagem para um novo antimicrobiano ou uma nova espécie (TOUTAIN et al., 2002).

O LEV, antimicrobiano pertencente a classe das fluoroquinolonas, é caracterizado pelo seu efeito bactericida concentração-dependente e por exercer efeito pós-antibiótico (EPA) moderado (ALIABADI; LEES, 2000; CRAIG, 2007; LODISE; DRUSANO, 2011). Nesses casos, os melhores índices de eficácia PK-PD são ASC/CIM e $C_{MÁX}/CIM$. Muitos estudos demonstraram que o índice ASC/CIM apresenta uma relação de eficácia ligeiramente melhor do que $C_{MÁX}/CIM$. O índice $C_{MÁX}/CIM$ parece ser mais relevante em infecções em que há grande risco de surgimento de subpopulações resistentes (CRAIG, 2007; LODE et al. 2008).

Um dos primeiros estudos clínicos em humanos para avaliar os índices de PK-PD e os desfechos clínicos de fluoroquinolonas foi realizado por Forrest et al. (1993). Neste estudo, valores de ASC/CIM ≥ 125 para CIP em microrganismos Gram-negativos foram significativamente associados à cura clínica e microbiológica. Assumindo uma ligação às proteínas de aproximadamente 30%, isto corresponde a valores de $fASC/CIM \geq 88$ em estimativas pré-clínicas (FORREST et al., 1993; ONUFRACK et al., 2017). Posteriormente, Drusano et al. (2004) demonstraram que ASC/CIM $\geq 87-110$ ($fASC/CIM \geq 61-77$) de levofloxacina teve um efeito estatisticamente significativo na erradicação do patógeno em pacientes com pneumonia bacteriana adquirida em hospital.

Contudo, infelizmente, esse alvo foi aplicado de forma inadequada a todos os outros microrganismos e a todas as outras populações de pacientes. Ambrose et al. (2001) demonstraram que os alvos terapêuticos dos índices PK-PD de fluoroquinolonas para microrganismos Gram-positivos parecem ser diferentes daqueles para microrganismos Gram-negativos. No estudo, os autores verificaram que uma razão de ASC/CIM $\geq 33,8$ ($fASC/CIM \geq 24$) estava associada a uma probabilidade de 95% de sucesso clínico.

A respeito do índice $C_{MÁX}/CIM$, Preston et al. (1998) sugeriram que $C_{MÁX}/CIM$ de 12,2 está relacionado resultados de sucesso clínico e cura microbiológica em pacientes tratados com LEV em infecções urinárias, pulmonares, pele e tecidos moles.

Desta forma, os alvos terapêuticos do levofloxacino são: $ASC/CIM \geq 87$ ($fASC/CIM \geq 61$) para microrganismos Gram-negativos e $ASC/CIM \geq 34$ ($fASC/CIM \geq 24$) para microrganismos Gram-positivos; e $C_{MÁX}/CIM \geq 12$.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Construir o regime posológico do LEV para o tratamento de infecções por diferentes espécies bacterianas em equinos.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método bioanalítico para quantificar o LEV em plasma de equinos por HPLC;
- Avaliar o perfil farmacocinético do LEV por administração intravenosa de dose única de 4 mg/kg em equinos;
- Avaliar o perfil farmacocinético do LEV por administração oral de dose única de 4 mg/kg em equinos;
- Determinar a CIM e CBM do LEV para as principais cepas bacterianas em equinos;
- Calcular os principais parâmetros de PK-PD para o LEV em equinos;

4 Material e Métodos

4.1 Soluções padrões, solventes e reagentes

- Acetato de etila, Synth - Brasil;
- Acetonitrila grau HPLC, J. T. Baker - México;
- Ácido fórmico 98%, Scharlab, S.L. - Espanha;
- Agar Müeller Hinton + 5% de sangue de carneiro (AS) - Biomérieux®;
- Agar Müeller-Hinton (AMH) - Difco®;
- Água ultrapura Mili-Q (Millipore®) com condutividade 18,2 $\mu\text{S. cm}^{-1}$;
- Ampicilina - Sigma Aldrich®;
- Caldo Müeller-Hinton (CMH) - Difco®;
- Dimetilsulfóxido (DMSO) - Sigma Aldrich®;
- Levofloxacino, padrão analítico - Sigma Aldrich®;
- Levofloxacino hemi-hidratado, comprimidos revestidos 750 mg - Tavok, Momenta Farmacêutica Ltda - Brasil;
- Levofloxacino hemi-hidratado, solução injetável 5 mg/mL - HalexIstar Indústria Farmacêutica - Brasil;

- Metanol grau HPLC, J. T. Baker - México;
- Norfloxacino, padrão analítico - Sigma Aldrich®;
- Resazurina - Sigma-Aldrich®.

4.2 Equipamentos

- Autoclave vertical - Phoenix®;
- Balança digital analítica e semi-analítica - Shimadzu®;
- Banho ultrassônico, Ultrasonic Cleaner 2840DA - Odontobrás;
- Câmara de fluxo laminar - Veco®;
- Centrífuga 5810 R - Eppendorf®;
- Estufa de incubação bacteriológica - Fanem®;
- Estufa de incubação bacteriológica com CO₂ - Forma Scientific®;
- Estufa incubadora com atmosfera de CO₂ (3110 Forma Series II water Jacketed CO₂ Incubator) - Thermo Electron Corporation®;
- Evaporador a vácuo, miVac Duo Concentrador - Genevac®;
- HPLC Waters Alliance e2695;
- Leitor de placa Power Wave HT- Biotek;
- Purificador de água destilada - Millipore®;
- Sistema Mili-Q Millipore®;
- Vórtex AP56 - Phoenix.

4.3 Correlatos

- Coluna C18 SunFire (4.6 x 250 mm; 5 µm), Waters®;
- Coluna de guarda C18 SunFire (4.6 x 20 mm; 5 µm), Waters®;
- Filtro de seringa de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofóbico, poro de 0,22µm, Analítica;
- Seringas descartáveis, BD®.

4.4 Softwares

- Empower 3, Waters®;
- Excel 2019, Microsoft®;
- Minitab 19 Statistical Software;
- Prism 5, GraphPad®.

4.5 Desenvolvimento do método bioanalítico

4.5.1 Sistema Cromatográfico

A análise do LEV em plasma foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) Alliance® Waters acoplado a um detector de massas de quadrupolo único (ACQUITY QDa, Waters). A separação dos analitos foi feita em coluna SunFire C18 (4,6 mm X 250 mm; 5 µm) com coluna de guarda SunFire C18 (4,6 mm X 20 mm; 5 µm), mantidas a 30°C. A fase móvel foi constituída por metanol e ácido fórmico 0,1 µM (30:70 v/v), em modo isocrático, com vazão de 0,7 mL/min, volume de injeção de 20 µL e o tempo total de corrida de 6 minutos. O QDa foi operado em modo positivo com ionização por eletrospray (ESI) e nas seguintes condições: voltagem do cone de 20 V, voltagem do capilar de 0,8 kV, fluxo do gás de dessolvatação de 800 L·h⁻¹ e temperatura da fonte de 600°C. A quantificação dos analitos foi realizada através do modo de monitorização selecionada dos íons (SIR) de m/z 362 e m/z 320, que correspondem ao LEV e ao padrão interno (PI) NOR, respectivamente.

4.5.2 Preparo da amostra

O preparo da amostra de plasma para a extração do LEV se iniciou com 500 µL de plasma adicionados de 20 µL de solução de PI (NOR 100 µg/mL em metanol) e 1000 µL de acetato de etila. A amostra foi agitada e centrifugada por 15 minutos a 15130 g a 4°C. O sobrenadante (800 µL) foi recolhido, evaporado e ressuspenso em 150 µL de metanol. As amostras foram filtradas e injetadas no sistema de HPLC-QDa

4.6 Validação do método bioanalítico

O processo de validação foi realizado de acordo as normas estabelecidas pela ANVISA (RESOLUÇÃO-RDC nº 27 de 17 de maio de 2012) e pela *Food and Drug Administration* (FDA) através do *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation* de maio de 2018. Para determinar os limites de confiança do método, foram feitos os seguintes ensaios: seletividade, sensibilidade, efeito residual, curva de calibração, precisão e exatidão intracorrída e intercorrída, recuperação e estabilidade de armazenamento.

4.6.1 Seletividade

A seletividade do método representa a capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito e PI na presença de outros componentes endógenos na matriz biológica de interesse. O ensaio foi realizado através da análise de amostras branco da matriz biológica de, no mínimo, seis fontes distintas, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada. Como critério de aceitação, as respostas dos picos interferentes próximos ao tempo de retenção do LEV devem ser inferiores a 20% da resposta do LEV nas amostras do limite inferior de quantificação (LIQ) e as respostas dos picos interferentes próximos ao tempo de retenção do PI não devem exceder a 5% da média das respostas do PI nos padrões de calibração e nos controles de qualidade.

4.6.2 Sensibilidade

A sensibilidade do método foi estabelecida através da determinação do LIQ, por meio da análise de amostras de concentrações decrescentes do LEV até que a menor concentração que fosse precisa ($\pm 20\%$) e exata ($\pm 20\%$) em, no mínimo, 5 replicatas. Para o LIQ ser aceito, é necessário que a resposta do analito seja, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra zero no tempo de retenção ao do analito.

4.6.3 Efeito residual

O ensaio de efeito residual analisou o aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI devido a contaminação originada de amostras analisadas anteriormente. O ensaio consistiu em analisar três 3 injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de amostras processadas do limite superior de quantificação (LSQ). Como critérios de aceitação, as respostas dos picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do LIQ, e as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% do PI.

4.6.5 Curva de calibração (Linearidade)

A curva de calibração estabelece a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Para a construção da curva de calibração, a faixa de concentrações dos padrões de calibração foi escolhida com base na faixa de

concentração esperada no estudo. A preparação dos padrões da curva de calibração foi iniciada com a adição do analito e do PI e depois submetidas ao mesmo procedimento de preparação a que foram submetidas as amostras em estudo.

A curva de calibração foi feita em triplicata com, no mínimo, 6 concentrações diferentes de padrões de calibração, incluindo a análise da amostra branco e da amostra zero. A equação da curva de calibração foi obtida a partir da relação entre a razão da área do pico do analito e do PI (área do analito/área do PI) com a concentração nominal do analito. Como critérios de aceitação, os padrões de calibração podem variar até $\pm 15\%$ da concentração nominal, exceto para o LIQ, que pode variar até $\pm 20\%$ da concentração nominal, 75% dos padrões de calibração devem ser aprovados conforme os critérios anteriores; e possuir um coeficiente de correlação $\geq 0,98$.

4.6.6 Precisão e Exatidão

A partir da curva de calibração, foram escolhidos os controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM), alto (CQA) e diluído (CQD) que servem para determinar a precisão e a exatidão.

A precisão e exatidão foi realizada com, no mínimo, 5 replicatas de 5 concentrações (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) em uma mesma corrida (intracorrída) e em corridas diferentes (intercorrídas). A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV) e a exatidão foi obtida pelo erro padrão relativo (EPR). Os critérios de aceitação para a precisão permitem uma variação de até $\pm 15\%$ do CV, exceto para o LIQ que admite uma variação de até $\pm 20\%$ do CV, e para exatidão é permitido uma variação de até $\pm 15\%$ da concentração nominal, exceto para o LIQ que admite uma variação de até $\pm 20\%$ da concentração nominal.

4.6.7 Recuperação

A recuperação expressa a eficiência do procedimento de extração da amostra em relação ao analito no extrato final do procedimento de preparo, extraído e não extraído (solução). A recuperação do analito e do PI não precisa ser de 100%, mas deve ser consistente e reproduzível. A recuperação foi calculada pelo percentual da área da amostra extraída de CQA e CQB em relação à amostra não extraída das mesmas concentrações.

4.6.8 Estabilidade de Armazenamento

A estabilidade química do analito foi avaliada devido a necessidade de armazenamento das amostras em diversas condições durante o estudo. A concentração das amostras foi determinada por meio de uma curva de calibração recém preparada e a estabilidade foi definida quando não se observou desvio $\pm 15\%$ da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

A estabilidade de curta duração foi determinada após as amostras permanecerem em temperatura ambiente por tempo superior ao que se espera para as amostras no decorrer do estudo, somente então foram processadas e analisadas.

A estabilidade de longa duração foi estabelecida após as amostras serem armazenadas por tempo superior ao intervalo compreendido entre a coleta da primeira amostra e análise da última, posteriormente, as amostras foram processadas e analisadas. A temperatura utilizada para o ensaio foi a mesma temperatura de armazenamento das amostras do estudo.

A estabilidade pós-processamento determinou a estabilidade do analito na amostra processada para análise, incluindo o padrão interno, na temperatura sob a qual a amostra foi mantida e por tempo superior à duração da corrida analítica.

A estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi determinada após as amostras serem congeladas a temperatura indicada e mantidas por pelo menos 12 horas, depois serem submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. O ciclo de congelamento e descongelamento foi realizado por no mínimo 3 vezes e, após isso, as amostras foram processadas e analisadas.

A estabilidade da solução-estoque do fármaco e do padrão interno foram estabelecidas após serem mantidas sob as mesmas condições a que foram submetidas as soluções durante uso e armazenamento. Os resultados foram comparados com os obtidos utilizando soluções recentemente preparadas.

4.7 Protocolo Clínico

4.7.1 Modelo Animal

Foram utilizados 6 equinos sem raça definida, idade média de 6 anos, machos e fêmeas, com peso corporal médio de 350 kg. A seleção de animais hígidos foi feita com base em suas histórias anteriores e exames físicos como frequência cardíaca e respiratória, coloração de mucosas, tempo de preenchimento capilar, temperatura

retal e motilidade intestinal. Os animais foram alojados em baias com cama de maravalha na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- FMVZ, Unesp (Botucatu-SP) e receberam feno de capim *coast cross* e água *ad libitum*. Antes do início de cada ensaio, os animais foram mantidos em jejum de 8 horas.

4.7.2 Desenho do estudo

O protocolo propôs um estudo experimental pela via intravenosa e oral em todos os animais em dois períodos. No período 1, os animais receberam administração pela via intravenosa e, no período 2, administração pela via oral, respeitando o período de depuração do fármaco (wash-out). Para ambas as vias, a dose administrada foi cerca de 4 mg/kg do LEV.

4.7.3 Administração dos fármacos

Para a via oral, os comprimidos do LEV foram administrados com 500 mL de água potável com auxílio de sonda nasogástrica em dose única. Para garantir a precisão da dose, foram administrados 2 comprimidos de LEV em cada animal e, posteriormente, a dose foi ajustada pelo peso corporal.

Para a via intravenosa, uma solução estéril do LEV 5 mg/mL foi preparada e a dose única foi administrada lentamente na veia jugular direita com auxílio de um cateter calibre 14G, sendo necessário em torno de 245 ml a 305 ml de solução de LEV.

4.7.4 Coleta de sangue

Antes de coletar a amostra de sangue, cerca de 5 mL de sangue foi coletado e descartado para evitar contaminação da amostra com qualquer resíduo de sangue presente no cateter. As amostras (5 mL) foram coletadas por aspiração em seringas através de cateteres fixados na veia jugular esquerda (contralateral a administração intravenosa) e foram transferidas para tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). As amostras foram imediatamente centrifugadas por 10 min a para obter plasma e armazenadas a -20°C.

As coletas de sangue, após a administração oral e intravenosa, foram realizadas nos seguintes tempos: 0 (antes da administração do medicamento), 5, 15, 30, 45 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 e 24 horas após administração de fármaco.

4.7.5 Avaliação clínica

Os animais foram submetidos a exames físicos e laboratoriais anteriormente e posteriormente ao estudo. Ao exame físico foram avaliados: frequência cardíaca e respiratória, coloração de mucosas, tempo de preenchimento capilar, temperatura retal e motilidade intestinal.

Exames laboratoriais foram realizados em dois momentos, sendo 24 horas antes do início do experimento e 24 horas após o término do experimento. Em cada momento foram coletadas duas amostras, sendo uma em tubo contendo EDTA para análise hematológica e outra em tubo seco com ativador de coagulação para análise bioquímica. As amostras foram enviadas ao laboratório para a realização de hemograma completo: hemoglobina; número de hemácias; hematócrito; contagem total e diferencial de leucócitos; proteína total e fibrinogênio e exame bioquímico das enzimas hepáticas (incluindo gama glutamina transferase, aspartato amino transferase e fosfatase alcalina), função renal (ureia e creatinina) e proteína total sérica e albumina. O acompanhamento clínico e laboratorial tem como objetivo certificar o bem-estar do animal, assegurando seu resgate, se necessário, bem como avaliar nefrotoxicidade e hepatotoxicidade.

4.8 Análise Farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos, obtidos através das curvas de concentração plasmática *versus* tempo, estão relacionados na **tabela 2**, assim como a forma de cálculo. Os cálculos serão feitos pelo Excel® e confirmados pelo Phoenix® WinNonlin® 7.0.

Tabela 2 - Descrição e método de cálculo dos parâmetros farmacocinéticos.

Parâmetros	Descrição	Equação ou método de cálculo
ASC_{0-T}	Área sob a curva de zero ao último tempo quantificável	Métodos dos Trapezoides
ASC_{0-INF}	Área sob a curva de zero extrapolado ao infinito	$ASC_{0-t} + C_n/K_{el}$ Onde C_n é a última concentração quantificável
K_{el} ou β	Constante de eliminação	Gráfico log da concentração plasmática v.s. tempo
$T_{1/2\beta}$	Meia-vida de eliminação	$\frac{\ln 2}{\beta}$
α	Constante de distribuição	Gráfico log da concentração plasmática v.s. tempo

$T_{1/2\alpha}$	Meia-vida de distribuição	$\frac{\ln 2}{\alpha}$
T_{ss}	Tempo para atingir o estado de equilíbrio	$\frac{\ln(\frac{\alpha}{\beta})}{\alpha - \beta}$
Cl	<i>Clearance</i> total	$\frac{Dose \times F}{ASC_{0-INF}}$
V_c	V_d no compartimento central	$\frac{Dose}{C_0}$
V_{ss}	V_d no estado no estado estacionário	$Cl \times MRT$
$V_{\text{área}}$	V_d no estado de pseudoequilíbrio	$\frac{Cl}{K_{el}}$
$ASMC_{0-T}$	Área sob o momento da curva de zero ao último tempo quantificável	Método da Estatística dos Momentos
$ASMC_{0-INF}$	Área sob o momento da curva de zero extrapolada ao infinito	$ASMC_{0-INF} + \frac{(C_n \times T_n)}{K_{el}} + \frac{C_n}{K_{el}^2}$ Onde T_n é o tempo de ocorrência da C_n
K_a	Constante de absorção	Gráfico log da concentração plasmática v.s. tempo
MAT	Tempo de absorção médio	$\frac{1}{K_a}$
MTT	Tempo de residência total	$\frac{ASMC_{0-INF}}{ASC_{0-INF}}$
MRT	Tempo de residência médio	$MTT - MAT$
$T_{1/2a}$	Meia-vida de absorção	$\frac{\ln 2}{K_a}$
$C_{M\acute{A}X}$	Concentração plasmática máxima	Método gráfico
$T_{M\acute{A}X}$	Tempo para obtenção de $C_{M\acute{A}X}$	Método gráfico
F_{oral}	Biodisponibilidade absoluta	$\frac{ASC_{0-INF (ORAL)} \times Dose_{(IV)}}{ASC_{0-INF (IV)} \times Dose_{(ORAL)}}$

Fonte: do autor (2020).

4.9 Avaliação da atividade antibacteriana

4.9.1 Microrganismos

Foram utilizadas as cepas padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Samonella* spp. ATCC 19196, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara.

4.9.2 Padronização da suspensão bacteriana

As cepas bacterianas foram repicadas do estoque para tubos contendo caldo Muller Hinton (CMH) e incubadas durante 24 horas a 37°C. Uma alíquota dessa cultura

foi transferida para tubos contendo CMH até obter-se turvação equivalente ao valor 0,5 da escala de MacFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). A padronização da suspensão bacteriana foi confirmada através da leitura espectrofotométrica a 620 nm dos valores de absorbância (0,10 a 0,15). Para realização dos ensaios de diluição em microplacas foi realizada uma diluição 1:10 em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL (CLSI, 2018a).

4.9.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

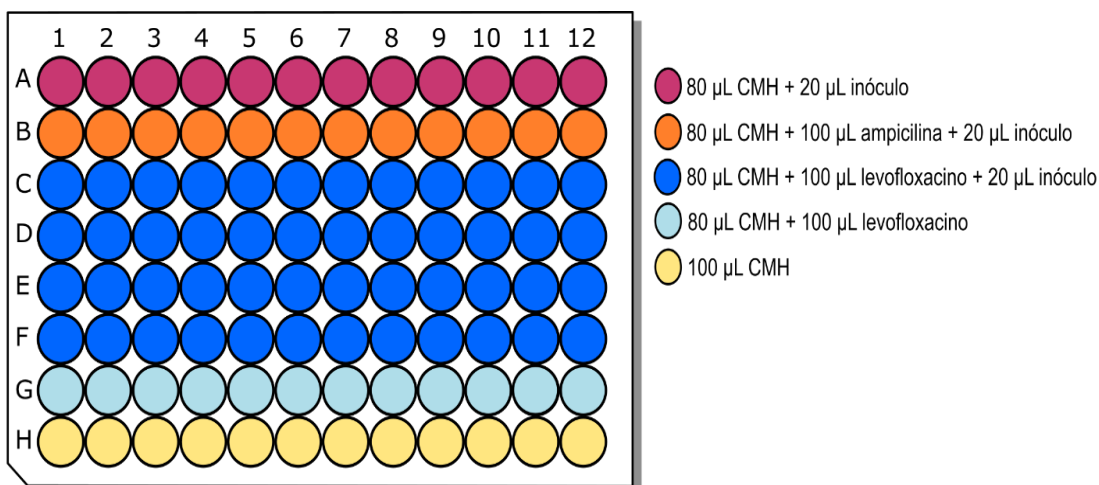
4.9.3.1 Realização do teste

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo o documento M07 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018a) para as bactérias aeróbias com modificações.

Nos testes para *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus* e *P. aeruginosa*, os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de CMH. Em seguida, foram acrescentados 100 µL da solução do LEV e realizada a diluição seriada de 1,0 µg/mL a 0,0005 µg/mL, exceto para *P. aeruginosa*, em que a diluição seriada foi de 2,5 µg/mL a 0,0012 µg/mL. Adicionalmente, foram distribuídos 20 µL das suspensões dos microrganismos em cada orifício das microplacas. Como controles positivos foram utilizados a ampicilina (5 µg/mL) para *S. aureus* e ampicilina (50 µg/mL) para as demais bactérias. Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, e o controle negativo (solvente).

Procedeu-se a incubação das microplacas a 37 °C durante 24 horas para *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Em cada microplaca, o LEV foi testado em quadruplicata. Os testes foram realizados em triplicata para cada microrganismo. Na **figura 8**, está apresentado a organização esquemática dos testes nas microplacas.

Figura 8 - Representação da microplaca para determinação da CIM.



Fonte: do autor (2020).

4.9.3.2 Leitura espectrofotométrica

Após a incubação, as microplacas foram submetidas à leitura de absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro de microplacas. A partir dos valores obtidos foram confeccionados os gráficos expressando a porcentagem de viabilidade dos microrganismos (GUDIÑA et al., 2010).

A inibição do crescimento microbiano foi evidenciada pela ausência de crescimento no meio, sendo considerada a CIM a menor concentração do LEV capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas (HAWSER e ISLAM, 1999; HÖRNER et al., 2008).

4.9.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após a leitura espectrofotométrica, foram realizadas as determinações da CBM. Com auxílio de hastes de madeira estéreis, a mistura de cada poço da microplaca foi replicada em placa de ágar Müller-Hinton (AMH). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Após incubação as placas foram analisadas para o crescimento ou não das bactérias.

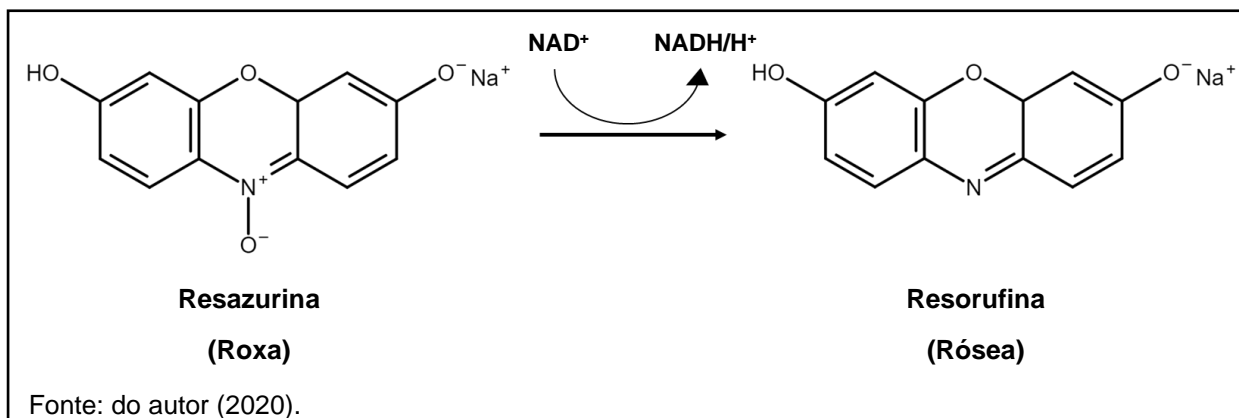
4.9.5 Leitura com revelador

Foram adicionados 30 µL de resazurina (100 µg/mL) em cada orifício das microplacas nos testes com bactérias e incubadas por 2 horas a 37°C (PALOMINO et al., 2002; RIVOIRE et al., 2007).

A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA

et al., 2003). Na **figura 9**, está apresentado o mecanismo que se baseia na redução da resazurina (cor roxa) em resorufina (cor rósea).

Figura 9 - Reação de redução da resazurina.



Essa mudança de cor roxa para rósea indica, além da redução de resazurina, a existência de crescimento bacteriano. A intensidade da coloração rósea tem correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos. Desta forma, o CIM foi definido como a menor concentração do LEV capaz de impedir a mudança de cor azul para rosa devido à redução da resazurina (PALOMINO et al., 2002; SARKER et al., 2007).

4.9.6 Cálculo da porcentagem de inibição do crescimento microbiano

A partir da leitura espectrofotométrica, é possível calcular a porcentagem de inibição do crescimento microbiano, em diferentes concentrações do LEV, para cada microrganismo de acordo com a **equação 11**:

Eq. 11

$$\% \text{ inibição do crescimento microbiano} = \left[1 - \frac{A_c}{A_0} \right] \times 100$$

Onde A_c representa a média das absorbâncias por concentração de substância testada e já subtraída do valor da absorbância obtida para cada concentração de substância sem a adição do inóculo e A_0 é a média das absorbâncias do controle de crescimento microbiano (sem a substância testada) (GUDIÑA et al., 2010). O resultado representa a porcentagem de células microbianas que a substância testada foi capaz de inibir. A partir disso, é possível determinar a CIM, que é a menor concentração de um antimicrobiano que inibe o crescimento de uma determinada cepa bacteriana. A unidade de medida para CIM é em $\mu\text{g/mL}$.

4.10 Modelo Farmacocinético-Farmacodinâmico (PK-PD)

Os índices de eficácia PK-PD do LEV foram calculados usando os parâmetros farmacocinéticos e os valores de CIM₉₀. Na **tabela 3**, estão representados todos índices PK-PD que foram calculados. Os cálculos foram feitos pelo Excel® e confirmados pelo Phoenix® WinNonlin® 7.0.

Tabela 3 – Descrição, fórmula, unidade e alvo terapêutico dos índices de eficácia de PK-PD.

Índice	Descrição	Fórmula	Unidade	Alvo terapêutico
ASC/CIM	Razão entre a ASC total para um período de 24 horas e o CIM.	$ASC/CIM = \frac{ASC_{0-24}}{CIM}$	Horas	≥34 (Gram +) ≥ 87 (Gram -)
C _{MÁX} /CIM	Razão entre a concentração plasmática máxima total obtida experimentalmente e o CIM.	$C_{MÁX}/CIM = \frac{C_{máx}}{CIM}$	Adimensional	12
T>CIM	Porcentagem de tempo durante um intervalo de 24h em que a concentração está acima do CIM.	$T > CIM = \frac{\Delta t_{Cp>CIM}}{24} \times 100$	%	50% - 80%

Fonte: do autor (2020).

4.11 Construção do regime posológico

O regime posológico foi construído com base nos cálculos descritos por Bousquet-Melou et al. (2002) e nos índices de PK-PD obtidos no estudo.

A dose por unidade de tempo foi obtida utilizando a **equação 12**:

(Eq. 12)

$$Dose_{por\ unidade\ de\ tempo} = \frac{Cl \times Cp_{alvo}}{F}$$

Onde Cp_{alvo} é a concentração plasmática alvo que corresponde a concentração média durante o intervalo de dose. A Cp_{alvo} pode ser obtida através da **equação 13**, usando o valor de ASCI (ou ASC/CIM).

(Eq. 13)

$$Cp_{alvo} = \frac{ASCI \times CIM}{24h}$$

A Cp_{alvo} pode ser substituída na equação 3, conforme demonstrado na **equação 14**:

(Eq. 14)

$$Dose_{por\ unidade\ de\ tempo} = \frac{Cl}{F} \times \frac{ASCI \times CIM}{24h}$$

Para algumas bactérias Gram-positivas, as fluoroquinolonas atuam como antibióticos tempo-dependentes. Nesses casos, a seleção do intervalo de dose apropriado é determinada pelo índice $T > CIM$.

Uma vez estabelecido o regime posológico, foram planejados os valores de $C_{MÁX}$ e $C_{MÍN}$, de acordo com as **equações 15 e 16**:

(Eq. 15)

$$C_{MÁX} = \frac{\frac{Dose \times F}{Vd}}{(1 - e^{-kel.\tau})}$$

(Eq. 16)

$$C_{MÍN} = C_{MÁX} \times e^{-kel.\tau}$$

Finalmente, após o planejamento, o valor de $C_{MÁX}$ foi avaliado se estava 12 vezes o valor de CIM ($C_{MÁX}/CIM \geq 12$) e se $C_{MÍN}$ foi superior ao CIM.

4.12 Análise Estatística

Os resultados dos parâmetros farmacocinéticos de cada grupo foram apresentados através da mediana, média aritmética e desvio padrão. Como os resultados apresentaram distribuição normal, foi empregado teste t para 2 amostras, com nível de significância fixado em 5%, através dos programas Minitab®.

5 Resultados e Discussão

5.1 Validação de método bioanalítico em plasma de equinos

5.1.1 Seletividade

Amostras de plasma branco de mais de seis fontes distintas foram extraídas e analisadas para verificar a presença de interferência de compostos endógenos. As

respostas de picos interferentes próximos aos tempos de retenção do PI e do LEV de 0,77% e 6,82%, respectivamente, sendo inferior ao limite estabelecido de 5% da área do PI e 20% da área do LIQ (0,015625 µg/mL).

Na **figura 10**, está apresentado o cromatograma do padrão de calibração do LEV na concentração de 0,015625 µg/mL (LIQ) sobreposto a amostra branco. Na **figura 11**, está o cromatograma da amostra zero sobreposto ao branco. O tempo de retenção (T_R) do LEV foi de aproximadamente 3,87 minutos e do PI foi em 3,97 minutos.

Figura 11 – Cromatogramas da amostra branco (linha azul) e do padrão de calibração no LIQ contendo 0,015625 µg/mL de LEV (linha vermelha).

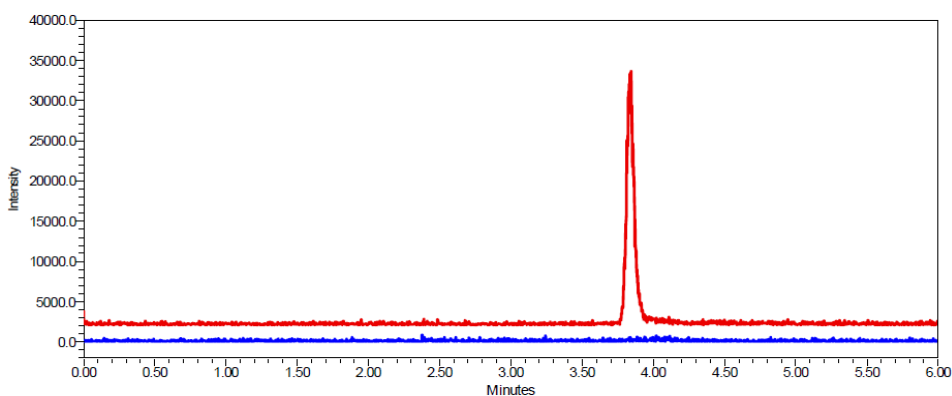
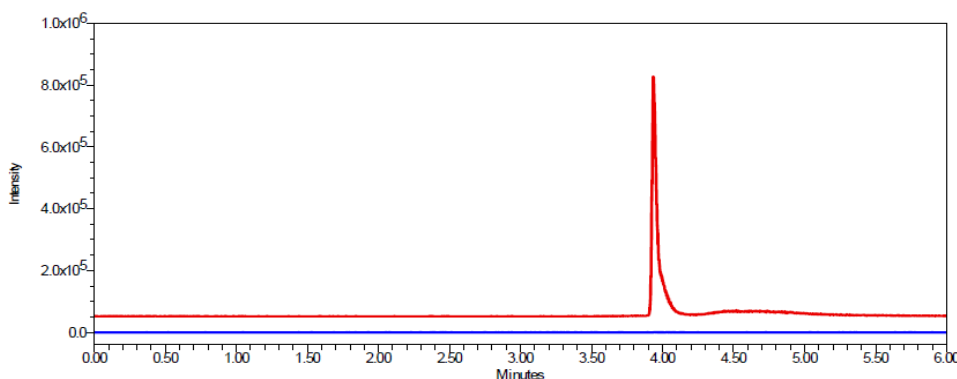


Figura 10 - Cromatogramas da amostra branco (linha azul) e da amostra zero (linha vermelha).



5.1.2 Sensibilidade

O LIQ foi estabelecido, a partir da determinação de 5 replicatas dos padrões de calibração, como 0,015625 µg/mL com base na relação entre ruído e linha de base de 5:1 e com exatidão de -6,41% e precisão de 10,57%, atendendo os critérios exigidos.

5.1.3 Efeito residual

As amostras de plasma branco injetadas após os padrões de calibração do LSQ (1,0 µg/mL) apresentaram respostas significativamente inferior a 20% do LIQ para o LEV e inferior a 5% para o PI, portanto, a ocorrência de efeito residual foi descartada.

5.1.4 Curva de calibração

A curva de calibração foi construída com 7 níveis de concentrações dentro da faixa de concentração de 0,015625 a 1,0 µg/mL de LEV em triplicata. Conforme está apresentado na **tabela 4**, os padrões de calibração tiveram uma variação inferior a 15% da concentração nominal, incluindo o LIQ. A curva de calibração foi considerada linear dentro da faixa de concentração avaliada (**figura 12**). A equação da reta foi $y = 5,859x + 0,03752$, obtida por ponderação ($1/y^2$) e seu coeficiente de determinação (r^2) foi de 0,9910.

Tabela 4 - Exatidão e precisão dos padrões da curva de calibração.

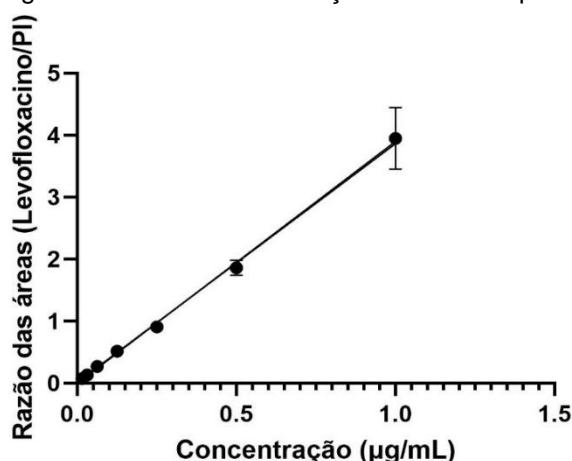
Concentração nominal (µg/mL)	Exatidão (ERP)	Precisão (CV%)
0,015625	-0,01	9,51
0,03125	-2,71	8,35
0,0625	3,47	0,39
0,125	1,92	4,32
0,25	8,60	6,67
0,5	1,29	5,80
1	-8,57	3,37

ERP= [concentração experimental - concentração nominal / concentração nominal] x 100

CV %= coeficiente de variação [(desvio padrão/média) x 100

Fonte: do autor (2020).

Figura 12 - Curva de calibração do LEV em plasma.



Fonte: do autor (2020).

5.1.4 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas por meio do LIQ e dos controles de qualidade CQB (0,03125 µg/mL), CQM (0,125 µg/mL), CQA (0,8 µg/mL) e CQD (5 µg/mL).

Tabela 5 - Precisão e exatidão intracorrida e intercorrida do método bioanalítico de LEV.

Concentração nominal (µg/mL)	Intracorrida (n=5)		Intercorrida (n=15)	
	Exatidão (ERP)	Precisão (CV%)	Exatidão (ERP)	Precisão (CV%)
LIQ 0,015625	-13,23	6,12	-7,1	11,53
CQB 0,03125	4,22	4,82	-4,72	10,25
CQM 0,125	-1,14	7,79	2,09	6,86
CQA 0,8	3,27	9,94	-2,74	11,16
CQD 5	12,66	12,36	0,43	12,6

CV %= coeficiente de variação [(desvio padrão/média) x 100]

ERP= [concentração experimental - concentração nominal / concentração nominal] x 100]

Fonte: do autor (2020).

Os resultados resumidos na **tabela 5** apresentam que a exatidão intracorrida e intercorrida do método expressado como ERP variaram de -13,23% a 12,66% e os de precisão intracorrida e intercorrida expressado como CV% variaram de 4,82% a 12,6%, estando todos dentro dos limites aceitáveis propostos pelos guias de validação de métodos bioanalíticos.

5.1.5 Recuperação

A eficiência da extração foi observada através dos resultados obtidos de amostras de CQB e CQA processadas e comparadas com solução padrão do analito, que representaram 100% de recuperação. A recuperação do LEV do plasma foi em torno de 26,51%, embora o ideal seja próximo de 100%, a extração foi suficiente, consistente e reprodutível, sendo satisfatória para análise farmacocinética. Na **tabela 6**, estão apresentados os resultados de recuperação.

Tabela 6 - Ensaio de recuperação do LEV em plasma.

Controle de Qualidade	Concentração (µg/mL)	Recuperação (%)
CQB	0,03125	20,59 ± 1,96
CQA	0,8	32,42 ± 0,11
Média		26,51 ± 6,93

Fonte: do autor (2020).

5.1.6 Estabilidade de armazenamento

O ensaio de estabilidade de armazenamento em plasma na validação do método bioanalítico tem como objetivo estabelecer condições adequadas e seguras para a estocagem das amostras durante o estudo. Portanto, após a coleta de uma amostra ela deve ser armazenada em uma condição que tenha sido avaliada neste ensaio. Na **tabela 7**, estão apresentados os resultados dos ensaios de estabilidade do LEV em plasma.

Tabela 7 - Estabilidade de armazenamento do LEV em plasma.

	CQB	CQA
Curta duração (16h em temperatura ambiente)		
N=3		
ERP (%)	+2,11	-6,53
CV (%)	10,94	9,30
Longa duração (10 meses a -80°C)		
N=3		
ERP (%)	+2,08	+2,14
CV (%)	6,10	3,31
Pós processamento (4h em temperatura ambiente)		
N=3		
ERP (%)	+2,62	+5,23
CV (%)	11,18	3,00
Ciclo de Congelamento e Descongelação (-80°C)		
N=3		
ERP (%)	+9,19	-1,55
CV (%)	6,61	6,36

CV %= coeficiente de variação [(desvio padrão/média) x 100]

ERP= [concentração experimental - concentração nominal / concentração nominal] x 100]

Fonte: do autor (2020).

Os resultados obtidos apresentam-se dentro dos limites aceitáveis determinados pelas legislações vigentes, garantindo que as condições de armazenagem testadas foram adequadas para evitar a degradação do analito em plasma.

5.2 Avaliação Clínica

Na **tabela 8**, estão representados os valores médios \pm desvio padrão (DP) de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), tempo de preenchimento capilar (TPC) e temperatura retal (T_{retal}), além dos resultados de coloração da mucosa e motilidade intestinal. A análise individual dos exames físicos de todos os animais se

manteve dentro dos padrões de normalidade, não apresentando alterações significativas, previamente e posteriormente ao experimento.

Tabela 8 – Resultados dos exames físicos de frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), tempo de preenchimento capilar (TPC) e temperatura retal (T_{retal}) (média \pm DP) e de coloração das mucosas e motilidade intestinal (n=6).

Parâmetros (unidades)	Resultados
FC (bpm)	34,29 \pm 5,03
FR (rpm)	12,38 \pm 2,80
TPC (s)	1,71 \pm 0,46
T_{retal} (°C)	37,04 \pm 0,44
Coloração da mucosa	Rósea
Motilidade intestinal	Normal

Tabela 9 – Resultados do hemograma completo fibrinogênio, bioquímico e suas referências (média \pm DP; n=6).

Parâmetro (unidade)	Resultado \pm DP	Referência
Hemácias ($1 \times 10^6/\mu\text{L}$)	6,55 \pm 1,19	6,8 - 12,9
Hemoglobina (g/dL)	10,62 \pm 1,39	11 - 19
Hematócrito (%)	31,55 \pm 3,80	32% - 53%
VCM (fL)	48,51 \pm 3,54	37 - 58,5
CHCM (%)	33,79 \pm 1,33	31 - 38,6
RDW	17,59 \pm 0,54	12,3 - 19,9
Proteína Plasma (g/dL)	6,86 \pm 0,60	5,8 - 8,7
Fibrinogênio (mg/dL)	377,78 \pm 151,68	100 - 400
Plaquetas ($1 \times 10^3/\mu\text{L}$)	208,72 \pm 44,67	100 - 600
Leucócitos ($1 \times 10^3/\mu\text{L}$)	8,19 \pm 3,17	5,4 - 14
Neutrófilos ($1 \times 10^3/\mu\text{L}$)	5,49 \pm 2,31	2,3 - 8,6
Linfócitos ($1 \times 10^3/\mu\text{L}$)	2,42 \pm 0,84	1,5 - 7,7
Eosinófilos (uni/ μL)	399,28 \pm 167,53	0 - 1000
Basófilos (uni/ μL)	25,33 \pm 49,00	0 - 290
Monócitos (uni/ μL)	233,00 \pm 227,91	0 - 1000
Ureia (mg/dL)	40,15 \pm 9,61	21 - 51
Creatinina (mg/dL)	1,04 \pm 0,15	0,9 - 1,9
AST (UI/L)	305,55 \pm 46,95	226 - 336
FA (UI/L)	173,00 \pm 39,31	138 - 251
GGT (UI/L)	12,93 \pm 3,02	4 - 44
Proteína Total Sérica (g/dL)	7,28 \pm 1,16	5,8 - 8,7
Albumina (g/dL)	2,81 \pm 0,31	2,9 - 3,8
Globulina (g/dL)	3,28 \pm 2,10	3,9 - 4,6
Bilirrubina total (mg/dL)	1,13 \pm 0,33	1 - 2
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,25 \pm 0,06	0 - 0,4
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,44 \pm 0,50	0,2 - 2

Fonte: do autor (2020).

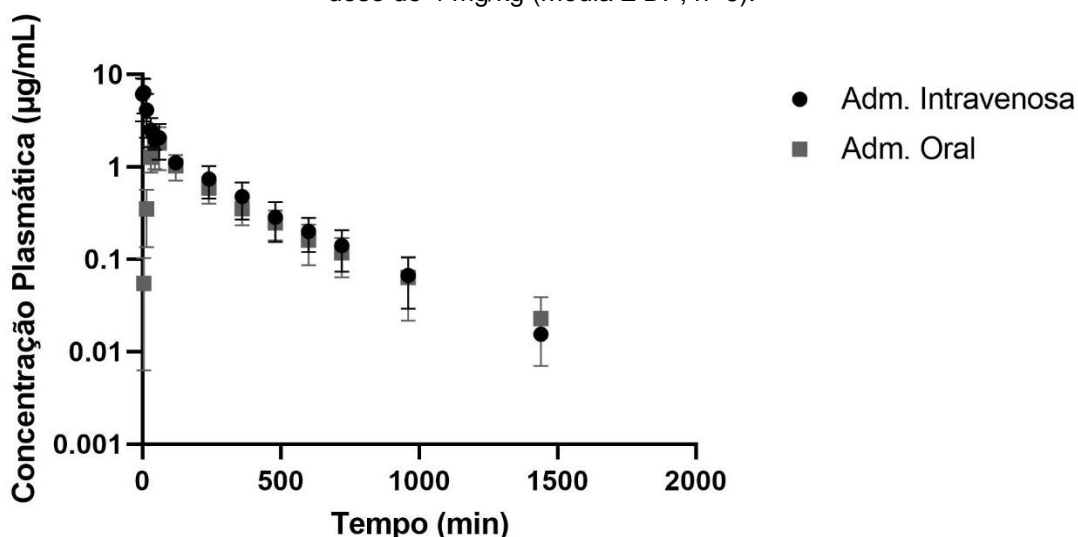
Na **tabela 9**, estão apresentados os resultados médios dos exames bioquímicos de todos os animais, estando todos próximos aos valores de referência para equinos. A análise individual dos exames de cada animal, previamente e posteriormente ao experimento, se manteve dentro dos padrões de normalidade, não apresentando alterações significativas. Isso indica que o LEV não altera funções fisiológicas após uma dose única.

5.3 Análise Farmacocinética (PK)

5.3.1 Plasma

O perfil farmacocinético do LEV após administração intravenosa e oral é caracterizado pelo modelo bicompartimental, pois apresenta duas velocidades de decaimento das concentrações, representadas graficamente por duas retas com inclinações diferentes (**figura 13**). Esse comportamento do LEV no organismo está em acordo com os resultados descritos em diversos estudos tanto em humanos quanto em animais (FISH; CHOW, 1997; PRESTON et. al 1998; ALBARELLOS et al., 2005; GOUDAH et al., 2008; ABOUBAKR; SOLIMAN, 2014).

Figura 13 - Perfis farmacocinéticos das concentrações plasmáticas de LEV (escala logarítmica) versus tempo (minutos) em equinos após administração intravenosa e oral na dose de 4 mg/kg (média \pm DP, n=6).



A partir da análise da curva de concentração plasmática *versus* tempo, foi possível calcular os parâmetros farmacocinéticos e estão apresentados na **tabela 10**.

Tabela 10 - Parâmetros farmacocinéticos do LEV (média \pm DP) determinados no plasma após administrações intravenosa e oral (4 mg/kg) em equinos (n=6).

Parâmetros (unidades)	Vias de Administração	
	Intravenosa	Oral
ASC _{0-T} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)	611,95 \pm 170,86	455,44 \pm 119,42
ASC _{0-inf} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)	628,40 \pm 181,02	466,36 \pm 126,54
R	0,98 \pm 0,02	0,98 \pm 0,01
K _a (min^{-1})	-	0,0487 \pm 0,0118
T _{1/2 a} (min)	-	15,10 \pm 4,36
α (min^{-1})	0,0331 \pm 0,0082	0,0103 \pm 0,0045*
T _{1/2 α} (min)	22,14 \pm 5,94	77,40 \pm 28,91*
β (min^{-1})	0,0031 \pm 0,0004	0,0026 \pm 0,0006
T _{1/2 β} (min)	230,27 \pm 31,11	283,23 \pm 64,32
T _{ss} (min)	81,92 \pm 15,11	243,00 \pm 36,93*
Cl (mL/min.kg)	6,86 \pm 2,09	6,86 \pm 2,09
V _c (mL/kg)	795,86 \pm 365,41	-
V _{área} (mL/kg)	2240,70 \pm 601,12	2734,94 \pm 753,80
V _{ss} (mL/kg)	1708,03 \pm 467,74	
ASMC _{0-T} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}^2/\text{mL}$)	137018,52 \pm 51830,47	128626,36 \pm 42629,82
ASMC _{0-inf} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}^2/\text{mL}$)	163345,39 \pm 74579,91	151996,87 \pm 60004,32
MAT (min)	-	21,79 \pm 6,29
MRT (min)	253,91 \pm 49,14	295,63 \pm 39,01
MTT (min)	253,91 \pm 49,14	317,42 \pm 39,87
C _{MÁX} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	-	2,08 \pm 0,79
T _{MÁX} (min)	-	50,00 \pm 12,25
F	-	0,73 \pm 0,19

*Valores médios significativamente diferentes (teste de T, $p < 0,05$).

5.3.1.1 Absorção (ASC, C_{MÍN}, C_{MÁX}, T_{MÁX}, T_{1/2 a}, MAT, F)

As ASCs após administração intravenosa e oral de LEV nos cavalos não apresentaram diferença estatisticamente significativa e tiveram um CV inferior a 30%, sugerindo uma baixa variabilidade na exposição à LEV (BOUSQUET-MELOU et al., 2002).

Após a administração oral, a detecção de LEV no plasma iniciou nos intervalos de tempos de 5 e 15 minutos, o que sugere que o fármaco é absorvido rapidamente. Isso é reforçado pelos parâmetros K_a, T_{1/2 a} e MAT que foram, em média, de 0,0487 minutos⁻¹, 15,10 minutos e de 21,79 minutos, respectivamente, confirmando a rápida absorção do LEV.

A C_{MÍN} e a C_{MÁX} foram, em média, de 0,023 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 2,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, após administração oral de 4 mg/kg de LEV. O T_{MÁX} ocorreu, em

média, 50 minutos após a administração oral. A F_{oral} foi de 73%, o que indica uma boa absorção por esta via. Não foi encontrado na literatura nenhum outro trabalho que reportasse a F_{oral} de LEV em cavalos. Entretanto, em espécies como patos (ABOUBAKR; SOLIMAN, 2014a) e tartarugas (ABOUBAKR; SOLIMAN, 2014b), a F_{oral} do LEV foi de 73,56% e 79,89%, respectivamente. Em comparação com o estudo de Goudah et al. (2008), a F do LEV pela via intramuscular foi de 91,76%, contudo essa diferença não é clinicamente significativa. Considerando outras fluoroquinolonas, o marbofloxacino (MARBO) apresentou uma F_{oral} de 58,9% (PEYROU et al., 2006) e 62,4% (BOUSQUET-MELOU et al., 2002) e o enrofloxacino (ENRO) teve uma F_{oral} de 55% (PEYROU et al., 2006).

5.3.1.2 Distribuição (V_c , $V_{\text{área}}$, V_{ss} , T_{ss})

A distribuição do LEV nos tecidos e fluidos pode ser avaliada a partir de diferentes formas de definir o V_d . Para a interpretação do V_d , é preciso considerar o volume plasmático da espécie em estudo, que corresponde de 7% a 8% da massa corporal (DIEHL et al., 2001; TOUTAIN; BOUSQUET-MELOU, 2004c). Considerando a massa corporal média dos cavalos de 354,17 kg, o volume sanguíneo é em torno de 26,6 L ou 0,075 L/kg. O valor mínimo de V_d para um fármaco corresponde ao próprio volume do plasma, caso não seja distribuído nos elementos figurados do sangue e no espaço extravascular (TOUTAIN; BOUSQUET-MELOU, 2004c).

Considerando que a disposição do LEV é melhor descrita pelo modelo bicompartimental, é interessante comparar V_c , V_{ss} e $V_{\text{área}}$ na administração intravenosa. O V_c foi de 795,86 mL/kg, esse valor não pode ser inferior ao volume de plasma do corpo (75 mL/kg). Durante a fase de distribuição, o V_d aumenta progressivamente e, ao alcançar o T_{ss} em 81,92 min, a distribuição entra em estado de equilíbrio e o V_d se atinge o V_{ss} de 1708,03 mL/kg. Após o T_{ss} , o V_d continua progredindo e alcança o $V_{\text{área}}$ de 2240,70 mL/kg. Conforme descrito por Toutain & Bousquet-Mélou (2004c), uma pequena diferença entre $V_{\text{área}}$ e V_{ss} é esperada para todos os fármacos, exceto para aqueles que tem sua maior parte eliminada antes de atingir o pseudoequilíbrio.

Como não houve diferença significativa entre o $V_{\text{área}}$ na administração intravenosa e oral, adotou-se um valor médio de $V_{\text{área}}$ de 2487,82 mL/kg, valor muito superior ao volume sanguíneo, demonstrando uma extensa distribuição do LEV nos fluidos e tecidos.

Os valores de V_c , V_{ss} e $V_{\text{área}}$ determinados nos estudos foram relativamente próximos aos valores relatados para ENRO em cavalos ($V_c = 551,89$ mL/kg, $V_{ss} = 1658$ mL/kg, $V_{\text{área}} = 1909$ mL/kg, PAPICH et al., 2002) e para MARBO em cavalos ($V_{\text{área}} = 2830$ mL/kg, BOUSQUET-MELOU et al., 2002; $V_{ss} = 1600$ mL/kg, PEYROU et al., 2006) e para orbifloxacino ($V_{ss} = 1580$ mL/kg, DAVIS et al., 2006).

5.3.1.3 Eliminação: **Clearance plasmático, constante de eliminação (β) e meia-vida de eliminação ($T_{1/2 \beta}$)**

A interpretação fisiológica $Cl_{\text{plasmático}}$ depende da avaliação do modelo de *clearance* corporal (Cl_{corporal}) descrito através da **equação 17** (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a):

(Eq. 17)

$$Cl_{\text{corporal}} = Q \times E$$

Onde “Q” corresponde ao fluxo sanguíneo no órgão eliminador e “E” é a taxa de extração corporal (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a).

O valor de “Q” pode ser determinado através do débito cardíaco (DC), que é uma propriedade específica de cada modelo animal (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a). Desta forma, o Cl_{corporal} pode ser calculado conforme a **equação 18**:

(Eq. 18)

$$Cl_{\text{corporal}} = DC \times E$$

O DC é diferente entre as espécies animais e pode ser calculado através da **equação 19**:

(Eq. 19)

$$DC \text{ (mL/min/kg)} = 180 \times \text{massa corporal (kg)}^{-0,19}$$

Considerando a massa corporal média dos cavalos de 354,17 kg, o DC médio foi de 59,01 mL/min/kg. Sabe-se que o fluxo de sangue para fígado e rins é aproximadamente 50% do débito cardíaco (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a), dessa forma o valor máximo de Cl_{corporal} deve ser próximo a 29,50 mL/min/kg, valor que corresponde ao débito cardíaco no órgão eliminador.

O cálculo de “E” é realizado através da **equação 20**:

(Eq. 20)

$$E = \frac{Cl_{\text{plasmático}}}{DC}$$

Sendo expressada como um valor numérico entre 0 e 1, que corresponde a porcentagem (de 0 a 100%) do fármaco que é eliminado durante uma única passagem no órgão eliminador. Devido ao fato do fluxo de sangue para fígado e rins ser aproximadamente 50% do débito cardíaco, o valor máximo da taxa de extração para esses órgãos é de 0,5 (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a). Os valores de E são considerados altos acima de 0,35, intermediários próximos a 0,15 e baixos próximos a 0,05, segundo Toutain & Bousquet-Mélou (2004a). O $Cl_{\text{plasmático}}$ médio foi de 6,86 mL/min/kg (0,41 L/h.kg) e a taxa de extração obtida foi de 0,12, portanto, são valores considerados intermediários.

O valor de $Cl_{\text{plasmático}}$ determinado no estudo foi superior ao valor encontrado por Goudah et al. (2008), que obteve um $Cl_{\text{plasmático}}$ de 3,5 mL/min/kg (0,21 L/h.kg). Na **tabela 1** apresentada anteriormente, os valores de $Cl_{\text{plasmático}}$ variam de 2,33 mL/min/kg a 5,33 mL/min/kg (0,14 a 0,32 L/h.kg), entre diversas espécies desde tartarugas a camelos. Em comparação com outras fluoroquinolonas, o MARBO apresentou um $Cl_{\text{plasmático}}$ de 4,62 mL/min/kg (PEYROU et al., 2006) e 4,15 mL/min/kg (BOUSQUET-MÉLOU et al., 2002); e o ENRO obteve um $Cl_{\text{plasmático}}$ de 6,34 mL/min/kg (PEYROU et al., 2006). Essas diferenças são relativamente comuns e estão frequentemente relacionadas à variação entre espécies, métodos de analíticos usados, a quantidade de tempo entre as coletas de sangue e/ou o estado de saúde e idade do animal (HADDAD et al., 1985).

A constante de eliminação (β) corresponde a inclinação da reta terminal e é uma maneira simples de expressar a eficiência de eliminação do fármaco (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004b). As constantes de eliminação entre os grupos intravenoso e oral não foram significativamente diferentes entre si, assumindo um valor médio de β de 0,0028 min⁻¹. Isso significa que durante a fase terminal de eliminação, cerca de 0,28% da quantidade residual de LEV é eliminada por minuto.

O valor de β de 0,0028 min⁻¹ determinado no estudo corresponde, em horas, a 0,17 h⁻¹. Portanto o valor foi menor que os valores reportados por Goudah et al. (2008), que obteve um β de 0,28 h⁻¹, e foram próximos aos valores referentes aos gatos (β = 0,14 h⁻¹; ALBARELLOS et al., 2005), cabras (β = 0,18 h⁻¹; GOUDAH; ABO-EL-SOUD, 2008) e ovelhas (β = 0,19 h⁻¹; GOUDAH; HASABELNABY, 2010)

apresentados na **tabela 1**. Outras fluoroquinolonas, apresentaram valores de β semelhantes como orbifloxacino ($\beta = 0,16 \text{ h}^{-1}$; DAVIS et al., 2006) e ENRO ($\beta = 0,12 \text{ h}^{-1}$; PAPICH et al., 2002).

Os valores de $t_{1/2\beta}$ dos grupos intravenoso e oral não apresentaram diferença estatística significativa entre si, portanto assumiu-se o valor médio de $t_{1/2\beta}$ de 256,75 min, ou seja, 4,28 h, um valor considerado intermediário. Esse valor de $t_{1/2\beta}$ determinado no estudo foi superior ao valor encontrado por Goudah et al. (2008), que obteve um $t_{1/2\beta}$ de 2,58 h e 2,94 h na administração intravenosa e intramuscular, respectivamente. Em comparação com diversas espécies, conforme apresentado na **tabela 1**, os valores de $t_{1/2\beta}$ do LEV variaram de 1,61 h (bezerros) a 9,31 h (gatos) e ficaram próximos aos valores determinados nas cabras ($t_{1/2\beta} = 3,64 \text{ h}$; GOUDAH; ABO-EL-SOUD, 2009), camelos ($t_{1/2\beta} = 3,47 \text{ h}$; GOUDAH, 2009), ovelhas ($t_{1/2\beta} = 3,58 \text{ h}$; GOUDAH; HASABELNABY, 2010) e tartarugas ($t_{1/2\beta} = 4,49 \text{ h}$; ABOUBAKR et al., 2014). Outras fluoroquinolonas, apresentaram valores maiores de $t_{1/2\beta}$ como MARBO ($t_{1/2\beta} = 7,28 \text{ h}$) e ENRO ($t_{1/2\beta} = 6,15 \text{ h}$), de acordo com o estudo de Peyrou et al. (2006).

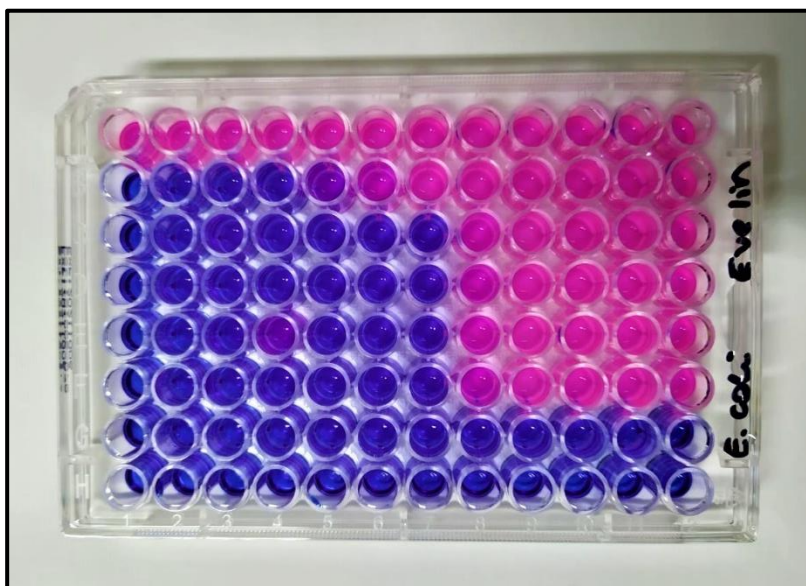
Na prática clínica, é previsto que o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio em um regime de doses múltiplas é de 21,40 h e o tempo necessário para atingir o *wash out* é de 42,80 h.

5.4 Análise Farmacodinâmica (PD)

5.4.1 Determinação da CIM e CBM

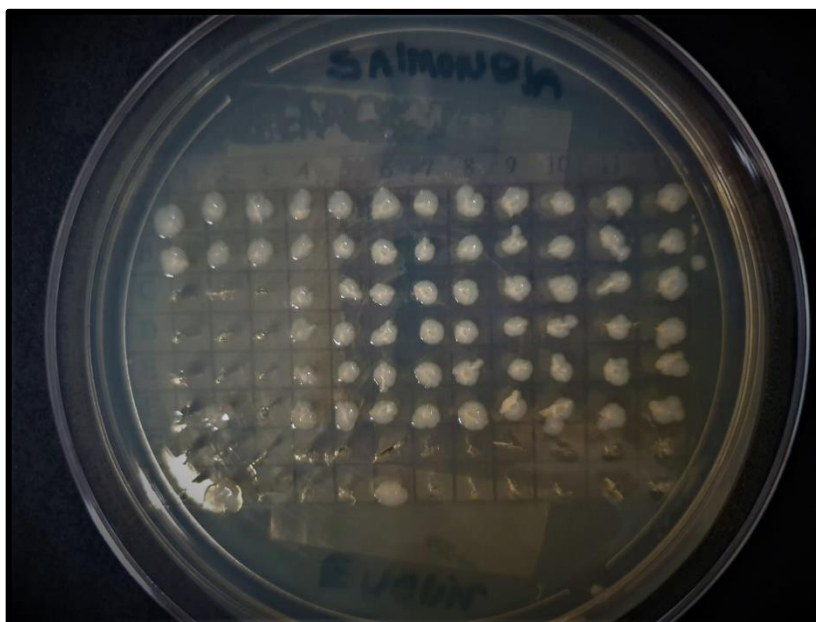
A CIM e a CBM do LEV foram determinadas em amostras bacterianas padrão através do método de microdiluição. As **figuras 14 e 15** mostram, representativamente, um ensaio de CIM com bactérias revelado com resazurina 0,01% e um ensaio de CBM, respectivamente.

Figura 14 - Foto do ensaio de microdiluição com bactérias revelado com resazurina (0,01%).



Fonte: do autor (2020).

Figura 15 - Foto do ensaio de concentração bactericida mínima (CBM) com bactérias.



Fonte: do autor (2020).

Os resultados dos ensaios de CIM e CBM estão representados no gráfico da **figura 16** e na **tabela 11**. Os valores de CIM₉₀ foram 0,016 µg/mL para *Escherichia coli* e 0,25 µg/mL para *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*, determinados num intervalo de concentração de 0,0005 µg/mL a 1,0 µg/mL. Para *Pseudomonas aeruginosa*, o intervalo de concentração foi de 0,0012 µg/mL a 2,5 µg/mL e CIM₉₀ foi 0,625 µg/mL. Os valores de CBM foram 0,031 µg/mL para *Escherichia coli*, 0,5 µg/mL

para *Staphylococcus aureus*, 0,25 µg/mL para *Salmonella* spp. e 1,25 µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa*. Os valores de CIM e CBM tem magnitudes semelhantes, o que indica que o LEV é um agente bactericida (BUFFÉ et al., 2001).

Figura 16 - (A) Porcentagem de inibição das cepas bacterianas de *E.coli*, *S. aureus* e *Samonella* spp. em diferentes concentrações de LEV. (B) Porcentagem de inibição da cepa bacteriana de *P. aeruginosa* em diferentes concentrações de LEV.

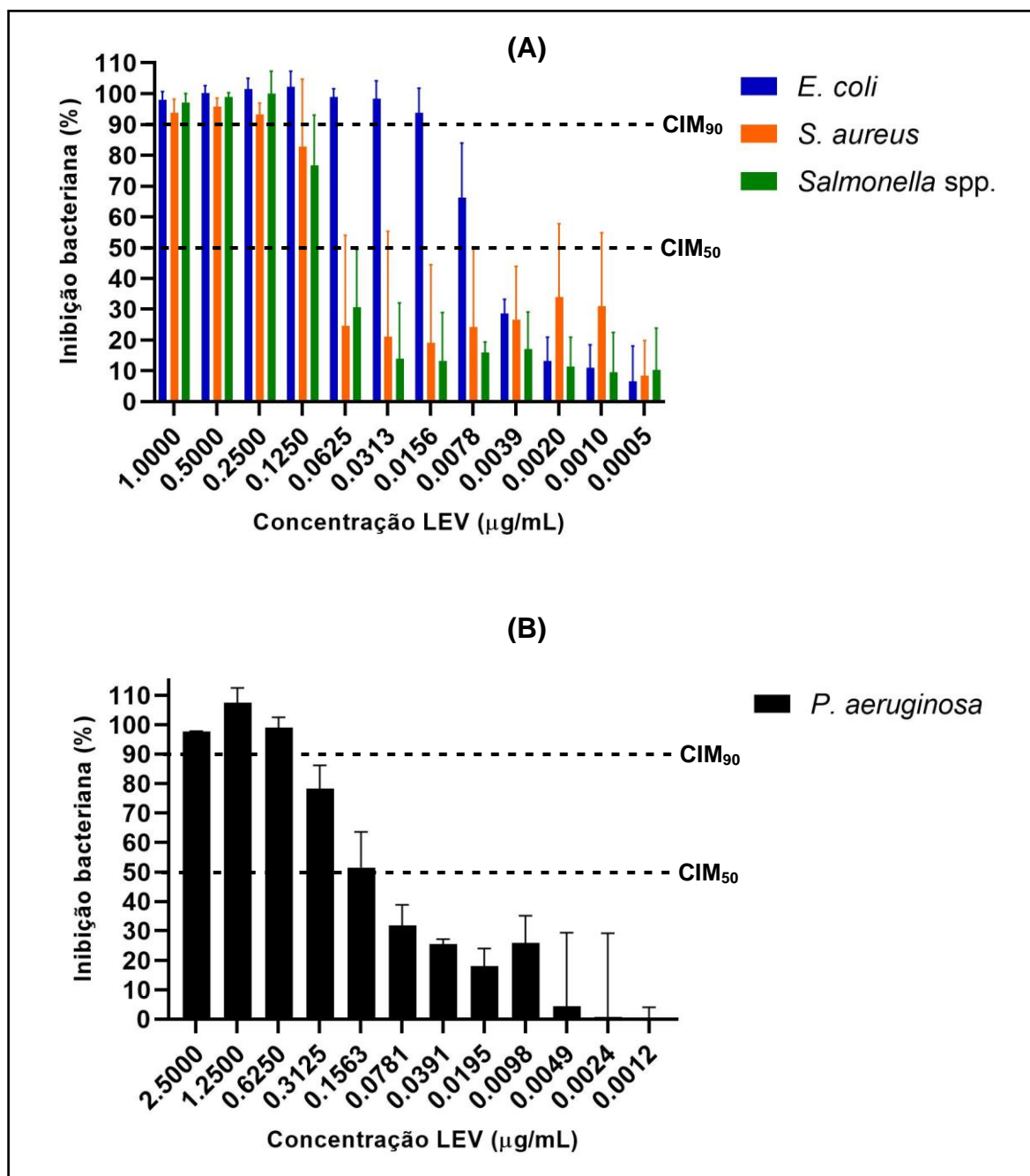


Tabela 11 - Atividade *in vitro* do LEV contra cepas padrão.

Cepas	Intervalo do CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	0,0005 – 1,0	0,016	0,031
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	0,0005 – 1,0	0,25	0,5
<i>Salmonella</i> spp. (ATCC 19196)	0,0005 – 1,0	0,25	0,25
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	0,0012 – 2,5	0,625	1,25

Nenhuma conclusão sobre eficácia e dose terapêutica pode ser tirada diretamente do valor de CIM. Somente quando são conhecidos com precisão parâmetros farmacológicos como distribuição no tecido, concentração no tecido alvo, taxa de eliminação, toxicidade, entre outros, o valor CIM pode ser usado para aplicações clínicas. Para uso clínico direto, a interpretação terapêutica dos pontos de corte (S, I ou R) é a base para o sucesso da terapia (IDDEX, 2019).

Quando os pontos de corte de sensibilidade não estão disponíveis para uma espécie veterinária, é possível utilizar os resultados de sensibilidade com base em um padrão humano, entretanto, não há garantia de que se aplique a um uso veterinário (PAPICH, 2014). O único ponto de corte de sensibilidade estabelecido para fluoroquinolonas em cavalos é do ENRO, que é categorizado como “S” para CIM \leq 0,12 $\mu\text{g/mL}$, “I” para CIM \leq 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e “R” para CIM \geq 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para Enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (CLSI, 2018b).

Como os critérios interpretativos de sensibilidade dos microrganismos ao LEV para animais ainda não foram estabelecidos, adotou-se os valores definidos pela BrCAST na “Tabela de pontos de corte para interpretação de CIM e diâmetros de halos” versão 10.0 de 2020. Os pontos de corte atuais estão apresentados na **tabela 12**.

Tabela 12 - Pontos de corte do LEV e do CIP de acordo com BrCAST (versão 10.0 de 2020).

Microrganismos	Antimicrobiano	S ≤	I	R >
Enterobacteriaceae	Levofloxacino	0,5	1	1
	Ciprofloxacino	0,25	0,5	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	Levofloxacino	0,001	0,002-1	1
	Ciprofloxacino	0,001	0,002-1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Levofloxacino	0,001	0,002-1	1
	Ciprofloxacino	0,001	0,002-0,5	0,5

Abreviações: S – sensível, dose padrão; I – sensível, aumentando exposição; R – resistente.
Concentrações em µg/mL.

Seguindo os critérios da BrCAST, *E. coli* e *Salmonella* spp. são classificados como “S” (sensível, dose padrão) para LEV na dose normalmente recomendada e *P. aeruginosa* e *S. aureus* são classificados como “I” (sensível, aumentando exposição) para LEV quando a exposição for aumentada ajustando-se o regime de dosagem ou sua concentração no local de infecção.

A comparação de sensibilidade dos microrganismos entre diferentes antimicrobianos não deve considerar apenas os valores de CIM, mas sim o quão distante o CIM está do ponto de corte de sensibilidade (PCS). Na **tabela 13**, está apresentado a comparação entre o LEV e o CIP, fluoroquinolonas amplamente utilizadas, através da relação entre PCS e CIM.

Tabela 13 - Cálculo do índice PCS/CIM do levofloxacino e ciprofloxacino.

Microrganismos	Antimicrobiano	CIM (µg/mL)	PCS*	PCS/CIM
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	Levofloxacino	0,016	0,5	31,25
	Ciprofloxacino	0,013 ^a	0,25	19,23
<i>Salmonella</i> spp. (ATCC 19196)	Levofloxacino	0,25	0,5	2
	Ciprofloxacino	0,5 ^b	0,06	0,12
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	Levofloxacino	0,25	0,001	0,004
	Ciprofloxacino	0,42 ^a	0,001	0,0024
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Levofloxacino	0,625	0,001	0,0016
	Ciprofloxacino	0,52 ^a	0,001	0,0019

*PC = Ponto de Corte;

^aDados extraídos de RIDDLE et al. (2000), ^bDados extraídos de ENSINK et al. (1993).

A relação PCS/CIM indica que quanto maior o seu valor, mais sensível é o microrganismo ao antimicrobiano. O LEV e o CIP pertencem a mesma classe de antimicrobianos e apresentam o mesmo mecanismo de ação, indicação e propriedades farmacocinéticas semelhantes. Contudo, os valores do índice PCS/CIM sugerem que os microrganismos são mais sensíveis ao LEV do que ao CIP. O CIP não tem seu uso recomendado pelo CLSI em nenhuma espécie veterinária porque a

análise PK-PD não suporta seu uso, e os isolados intermediários ou resistentes a qualquer fluoroquinolona podem apresentar risco aumentado de desenvolver resistência a todas as fluoroquinolonas (CLSI, 2018b).

A seleção do antimicrobiano mais adequado também deve levar em consideração fatores como as concentrações do fármaco no local da infecção, idade do paciente, espécie animal, saúde do animal, modo de ação (bacteriostático/bactericida), espectro de ação, farmacocinética, restrição de uso, segurança, facilidade de uso, frequência e via de administração (CLSI, 2018b).

5.5 Farmacocinética e farmacodinâmica (PK-PD)

Os índices PK-PD obtidos no estudo estão resumidos na **tabela 14**.

Tabela 14 - Valores dos índices de eficácia ASC/CIM (h), ASCI (h), $C_{MÁX}/CIM$ e $T > CIM$ (%) calculado a partir dos parâmetros farmacocinéticos obtido após a administração de 4 mg/kg de LEV intravenosa (I.V) e via oral (V.O) em cavalos (n=6). Os dados são apresentados como média \pm DP.

Índices PK-PD	I.V	V.O
$CIM_{90} = 0,016 \mu\text{g/mL} - E. coli$		
ASC/CIM (h)	637,45 \pm 177,98	441,85 \pm 139,12
ASCI (h)	626,12 \pm 180,59	441,73 \pm 139,07
$C_{MÁX}/CIM$	398,55 \pm 160,97	122,36 \pm 55,04
$T > CIM$ (%)	88,89 \pm 17,21	98,73 \pm 0,68
$CIM_{90} = 0,25 \mu\text{g/mL} - S. aureus e Salmonella spp.$		
ASC/CIM (h)	40,80 \pm 11,39	28,28 \pm 8,90
ASCI (h)	36,87 \pm 10,80	24,59 \pm 8,83
$C_{MÁX}/CIM$	25,51 \pm 12,51	7,83 \pm 3,52
$T > CIM$ (%)	41,67 \pm 5,27	36,11 \pm 6,48
$CIM_{90} = 0,625 \mu\text{g/mL} - P. aeruginosa$		
ASC/CIM (h)	16,32 \pm 4,56	11,31 \pm 3,56
ASCI (h)	12,90 \pm 4,15	7,26 \pm 2,50
$C_{MÁX}/CIM$	10,98 \pm 5,00	3,13 \pm 1,41
$T > CIM$ (%)	25,00 \pm 5,27	19,27 \pm 4,41

Visto que na medicina veterinária os índices PK-PD ainda não foram estabelecidos, adota-se os valores dos pontos de corte disponíveis para os índices de eficácia referentes a terapia antimicrobiana humana (BOUSQUET-MELÓU et al., 2002). Conforme dito anteriormente, estudos demonstraram que, para as fluoroquinolonas, o índice ASC/CIM apresenta uma relação de eficácia melhor do que $C_{MÁX}/CIM$ (BULIK et al. 2017) e o índice $C_{MÁX}/CIM$ parece ser mais relevante em

infecções em que há grande risco de surgimento de subpopulações resistentes (CRAIG, 2007; LODE et al. 2008).

Os valores dos índices de PK-PD do LEV calculados para a atividade de erradicação da *E. coli* ($CIM_{90}=0,016 \mu\text{g/mL}$) superaram grandemente todos os alvos terapêuticos ($ASC/CIM \geq 87$ e $C_{M\acute{A}X}/CIM \geq 12$) tanto na administração intravenosa quanto na oral. Isso sugere que o regime posológico de 4 mg/kg/dia de LEV é adequado para tratar infecções por *E. coli*.

Contudo, essa situação não se repete com as outras bactérias Gram-negativas. O valor de $C_{M\acute{A}X}/CIM$ foi superior a 12 na via intravenosa e inferior na via oral para o CIM_{90} da *Salmonella* spp. Ainda, o valor de ASC/CIM ficou abaixo de 87 tanto na via oral quanto na via intravenosa para o CIM_{90} da *Salmonella* spp. Para o CIM_{90} da *P. aeruginosa*, os valores de ASC/CIM e $C_{M\acute{A}X}/CIM$ não atingiram os alvos terapêuticos na via oral e nem na via intravenosa. Estudos indicam que quando o valor do índice ASC/CIM é menor que o estabelecido, a porcentagem de erradicação microbiológica é menor (AMBROSE et al., 2001) e/ou o tempo necessário para erradicação é maior (ZELENITSKY; ARIANO, 2010) e quando $C_{M\acute{A}X}/CIM$ está abaixo do recomendado, o risco de surgimento de populações resistentes é significativo (CRAIG, 2007). Os dados revelam que é necessário o ajuste do regime posológico do LEV para o tratamento de infecções causadas *Salmonella* spp. e *P. aeruginosa*.

Como apontado anteriormente, o alvo terapêutico do índice ASC/CIM de fluoroquinolonas para microrganismos Gram-positivos é diferente dos microrganismos Gram-negativos (WRIGHT et al., 2000). Desta forma, em relação ao CIM_{90} da *S. aureus*, o valor do índice ASC/CIM foi superior a 34 na via intravenosa, enquanto na via oral ficou abaixo, porém muito próximo. O valor de $C_{M\acute{A}X}/CIM$ foi superior a 12 na via intravenosa e inferior na via oral para o CIM_{90} da *S. aureus*. Os resultados indicam que o regime posológico de 4 mg/kg/dia de LEV pela via intravenosa é suficiente para tratar infecções por *S. aureus*.

5.6 Construção do Regime Posológico

Com base em estudos realizados, $ASC/CIM \geq 87$ e $ASC/CIM \geq 34$ foram propostos como os valores alvo para garantir a eficácia clínica do LEV contra microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos, respectivamente (AMBROSE et al., 2001; DRUSANO et al., 2004). Esses valores correspondem, respectivamente, a uma concentração plasmática média em 24 h igual a 3,63 vezes ($87/24$) o CIM_{90} das

bactérias Gram-negativas e a 1,42 vezes (34/24) o CIM₉₀ das bactérias Gram-positivas. Isso significa que a concentração plasmática alvo para *Salmonella* spp. (CIM₉₀= 0,25 µg/mL) é 0,91 µg/mL, para *S. aureus* (CIM₉₀= 0,25 µg/mL) é 0,35 µg/mL e para *P. aeruginosa* (CIM₉₀= 0,625 µg/mL) é 2,27 µg/mL.

Para determinar os regimes posológicos do LEV pela via oral para o CIM₉₀ da *S. aureus* e pela via oral e intravenosa para o CIM₉₀ da *Salmonella* spp. e *P. aeruginosa*, utiliza-se a **equação 12** descrita anteriormente:

(Eq. 12)

$$Dose_{diária} = \frac{Cl \times \frac{ASC}{CIM} \times CIM}{F}$$

Onde ASC/CIM é o valor proposto como alvo para bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas (87 ou 34). Desta maneira, as doses diárias determinadas para o LEV na administração oral para *S. aureus* e na administração oral e intravenosa para o *Salmonella* spp. e *P. aeruginosa* estão apresentadas na **tabela 15**.

Tabela 15 - Doses diárias de LEV calculadas para cada microrganismo, considerando um Cl de 411,6 mL/h/kg, F de 73% e ASC/CIM de 87 (Gram-negativos) e 34 (Gram-positivos).

Microrganismos	CIM ₉₀ (µg/mL)	Cp _{alvo} (µg/mL)	Dose _{iv} (mg/kg)	Dose _{oral} (mg/kg)
<i>E. coli</i>	0,016	0,06	0,57	0,78
<i>S. aureus</i>	0,25	0,35	3,50	4,79
<i>Salmonella</i> spp.	0,25	0,91	8,95	12,26
<i>P. aeruginosa</i>	0,625	2,27	22,38	30,66

As doses diárias estimadas para *E. coli* foram muito inferior a dose avaliada no estudo, indicando que uma dose menor pode ser eficaz para esta bactéria. As doses diárias estimadas para *S. aureus* foram muito próximas a dose avaliada no estudo, sugerindo que um pequeno ajuste na dose oral para 5 mg/kg já seria suficiente para obter um tratamento eficaz. Entretanto, as doses estimadas para *Salmonella* spp. e *P. aeruginosa* foram muito superiores a dose avaliada no estudo. O uso de altas doses de LEV é contraindicado devido ao alto risco de reação adversas moderadas e até graves. Em um estudo, Yamarik et al. (2009) avaliou a farmacocinética e toxicidade de CIP em equinos. Após a administração oral de 20 mg/kg de CIP, todos os animais apresentaram eventos adversos atribuíveis à administração de CIP como diarreia transitória leve a colite grave, endotoxemia e laminite, necessitando da eutanásia de

três animais. Além desses efeitos adversos relatados no estudo, outros efeitos reconhecidos ligados ao uso de fluoroquinolonas como o LEV são tendinite, ruptura de tendões, neuropatia periférica, miastenia gravis, prolongamento do QT e torsade de pointes. Portanto, com base nas observações desse estudo, não é recomendado o uso de altas doses para terapia antimicrobiana em equinos (FDA, 2008).

Por fim, é possível prever que, para o regime posológico de 4 mg/kg/dia de LEV, um ASC/CIM ≥ 87 pode ser obtido para microrganismos Gram-negativos com CIM₉₀ $\leq 0,08$ $\mu\text{g/mL}$ e 0,11 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para via oral e intravenosa; e um ASC/CIM ≥ 34 pode ser obtido para microrganismos Gram-positivos com CIM₉₀ $\leq 0,21$ $\mu\text{g/mL}$ e 0,29 $\mu\text{g/mL}$ para via oral e intravenosa, respectivamente.

6 Considerações finais

6.1 Conclusão

Um método bioanalítico simples e rápido foi desenvolvido em HPLC-QDA para a determinação de LEV em amostras de plasma de cavalos. O método requer um volume de amostra pequeno, um processamento de amostra líquido-líquido simples e uma corrida cromatográfica curta em modo isocrático. Além disso, o método é sensível, específico, preciso e confiável, podendo ser aplicado com sucesso a estudos de farmacocinética em equinos.

Este é o primeiro estudo a comparar os perfis farmacocinéticos oral e intravenoso do LEV em cavalos. O estudo farmacocinético demonstrou que o LEV é caracterizado pelo modelo bicompartimental e apresenta uma absorção oral boa ($F_{\text{oral}} = 73\%$) e rápida ($T_{\text{MÁX}} = 50$ min), uma extensa distribuição do LEV nos fluidos e tecidos ($V_{\text{área}} = 2487,82$ mL/kg) e eliminação intermediária ($Cl_{\text{plasmático}} = 6,86$ mL/min/kg e $T_{1/2\beta} = 4,28$ h).

A partir do modelo farmacodinâmico *in vitro*, foi investigada a atividade bacteriana do LEV contra *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *P. aeruginosa* através da determinação do CIM₉₀, que foram, respectivamente, os valores de $<0,016$ $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e 0,625 $\mu\text{g/mL}$. Como nenhuma conclusão sobre eficácia e dose terapêutica pode ser tirada diretamente do valor de CIM, adotou-se os critérios da BrCAST para interpretação terapêutica dos pontos de corte (S, I ou R), em que o LEV é classificado como S (sensível, dose padrão) para *E. coli* e *Salmonella* spp. e como I (sensível, aumentando exposição) para *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Neste estudo, o regime posológico de 4 mg/kg/dia de LEV foi adequado para tratar infecções por *E. coli* tanto pela via intravenosa quanto pela via oral; e para tratar infecções por *S. aureus* pela via intravenosa. Contudo, o regime posológico não foi suficiente para atingir os valores de $ASC/CIM \geq 34$ e $C_{MÁX}/CIM \geq 12$ para o CIM_{90} da *S. aureus* pela via oral, sendo necessário aumentar as doses de LEV para 5 mg/kg/dia para atingir os alvos terapêuticos de PK-PD. O regime posológico avaliado no estudo também não foi suficiente para atingir os valores de $ASC/CIM \geq 87$ e $C_{MÁX}/CIM \geq 12$ para o CIM_{90} da *Salmonella* spp. e *P. aeruginosa*. Entretanto, as doses estimadas de LEV para um tratamento eficaz contra *Salmonella* spp. e *P. aeruginosa* são muito altas, sendo contraindicadas devido ao elevado risco de eventos adversos.

Além disso, o regime posológico de 4 mg/kg/dia de LEV pode ser indicado para tratar infecções por microrganismos Gram-negativos com $CIM_{90} \leq 0,08 \mu\text{g/mL}$ pela via oral e com $CIM_{90} \leq 0,11 \mu\text{g/mL}$ pela via intravenosa, assim como, tratar infecções por microrganismos Gram-positivos com $CIM_{90} \leq 0,21 \mu\text{g/mL}$ e $0,29 \mu\text{g/mL}$ pela via oral e intravenosa, respectivamente.

Por fim, pode se concluir que, devido ao seu amplo espectro de atividade e comportamento farmacocinético favorável, o LEV tem potencial para tratar uma ampla variedade de infecções bacterianas em cavalos, mas são necessários mais ensaios farmacocinéticos, farmacodinâmicos e clínicos para determinar sua eficácia e segurança antimicrobiana nos equinos.

Referências

- ABOUBAKR, M. Pharmacokinetics of levofloxacin in Japanese quails (*Coturnix japonica*) following intravenous and oral administration. **British poultry science**, v. 53, n. 6, p. 784-789, 2012.
- ABOUBAKR, M.; SOLIMAN, A. Comparative pharmacokinetics of levofloxacin in healthy and renal damaged muscovy ducks following intravenous and oral administration. **Veterinary medicine international**, v. 2014, 2014a.
- ABOUBAKR, M.; UNEY, K.; ELMAS, M. Bioavailability and pharmacokinetic profile of levofloxacin following intravenous, intramuscular and oral administration in turkeys. **British poultry science**, v. 55, n. 1, p. 115-119, 2014b.
- ALBARELLOS, G. A.; AMBROS, L. A.; LANDONI, M. F. Pharmacokinetics of levofloxacin after single intravenous and repeat oral administration to cats. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 28, n. 4, p. 363-369, 2005.
- ALIABADI, F. S.; LEES, P. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimisation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 4, p. 307-313, 2000.
- ALONSO, J. M.; ROSA, G. S.; SANTOS, B.; GUERRA, S.; RIBEIRO, M.; et al. Adjuvant intraperitoneal ceftriaxone in the treatment of septic peritonitis in horses. **Veterinary Record**, v. 187, n. 4, p. e29-e29, 2020.
- AMBROSE, P. G.; GRASELA, D. M.; GRASELA, T. H. Pharmacodynamics of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* in patients with community-acquired respiratory tract infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 10, p. 2793-2797, 2001.
- ANDERSON, V. R.; PERRY, C. M. Levofloxacin. **Drugs**, v. 68, n. 4, p. 535-565, 2008.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. suppl 1, p. 5-16, 2001.
- BOUSQUET-MELOU, A.; BERNARD, S.; SCHNEIDER, M.; TOUTAIN, P. L. Pharmacokinetics of marbofloxacin in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 4, p. 366-372, 2002.
- BOUSQUET-MÉLOU, A.; SCHNEIDER, M.; EL GARCH, F.; BROUSSOU, D. C.; FERRAN, A. A.; LALLEMAND, E. A.; ... TOUTAIN, P. L. Determination of the pharmacokinetic-pharmacodynamic cut-off values of marbofloxacin in horses to support the establishment of a clinical breakpoint for antimicrobial susceptibility testing. **Equine Veterinary Journal**, v. 53, n. 5, p. 1047-1055, 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 898, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência”. Diário Oficial da União. Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 27 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.

BUFFE, C.; ARAÚJO, B. V. D.; DALLA COSTA, T. C. T. Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos na otimização de terapias antimicrobianas. **Caderno de farmácia**, v. 17, n. 2, p. 97-109, 2001.

BULIK, C. C.; BADER, J. C.; ZHANG, L. PK–PD Compass: bringing infectious diseases pharmacometrics to the patient’s bedside. **Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics**, v. 44, n. 2, p. 161-177, 2017.

CARRETERO, M.; RODRÍGUEZ, C.; SAN ANDRÉS, M.I.; et al. Pharmacokinetics of marbofloxacin in mature horses after single intravenous and intramuscular administration. **Equine veterinary journal**, v. 34, n. 4, p. 360-365, 2002.

CHIEN, S. C.; ROGGE, M. C.; GISCLON, L. G.; CURTIN, et al. Pharmacokinetic profile of levofloxacin following once-daily 500-milligram oral or intravenous doses. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 10, p. 2256-2260, 1997.

CHILD, J.; MORTIBOY, D.; ANDREWS, J. M.; CHOW, A. T.; WISE, R. Open-label crossover study to determine pharmacokinetics and penetration of two dose regimens of levofloxacin into inflammatory fluid. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2749-2751, 1995.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, 4th ed. CLSI supplement VET08, Wayne, USA, 2018b.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. M07, 11th ed. Wayne, USA, 2018a.

CRAIG, W. A. Post-antibiotic effects in experimental infection models: relationship to in-vitro phenomena and to treatment of infections in man. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 31, p. 149-158, 1993.

CRAIG, W.A. Pharmacodynamics of antimicrobials: general concepts and applications. In: NIGHTINGALE, C.H.; AMBROSE, P.G.; DRUSANO, G.L.; MURAKAWA, T. (eds) **Antimicrobial pharmacodynamics in theory and clinical practice**, 2nd. New York: Informa Healthcare, p. 1–19, 2007.

CROOM, K. F.; GOA, K. L. Levofloxacin. **Drugs**, v. 63, n. 24, p. 2769-2802, 2003.

DALLA COSTA, T.; DERENDORF, H. AUC - a general target for the optimization of dosing regimens of antibiotics? **Annals of Pharmacotherapy**, v. 30, n. 9, p. 1024-1028, 1996.

DAVIS, J. L. Treatment of peritonitis. The Veterinary clinics of North America. **Equine practice**, v. 19, n. 3, p. 765-778, 2003.

DAVIS, J. L.; PAPICH, M. G.; WEINGARTEN, A. The pharmacokinetics of orbifloxacin in the horse following oral and intravenous administration. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 29, n. 3, p. 191-197, 2006.

DAVIS, R.; BRYSON, H. M. Levofloxacin. **Drugs**, v. 47, n. 4, p. 677-700, 1994.

DIEHL, K. H. et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 15- 23, 2001.

DRUSANO, G. L.; PRESTON, S. L.; FOWLER, C.; CORRADO, M.; WEISINGER, B.; KAHN, J. Relationship between fluoroquinolone area under the curve: minimum inhibitory concentration ratio and the probability of eradication of the infecting pathogen, in patients with nosocomial pneumonia. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 9, p. 1590-1597, 2004.

DUMKA, V. K.; SRIVASTAVA, A. K. Pharmacokinetics, urinary excretion and dosage regimen of levofloxacin following a single intramuscular administration in cross bred calves. **Journal of veterinary science**, v. 7, n. 4, p. 333-337, 2006.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Redefining susceptibility testing categories S, I and R, 2019. Disponível em: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_Presentations/2018/EUCAST_-_Intermediate_category_-_information_for_all.pdf. Acesso em: 20 de outubro de 2020.

FDA Label, Levaquin®, levofloxacin. Janssen Pharmaceuticals, USA, 2008.

FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). 2018.

FISH, D. N.; CHOW, A. T. The clinical pharmacokinetics of levofloxacin. **Clinical pharmacokinetics**, v. 32, n. 2, p. 101-119, 1997.

FORREST, A. L. A. N.; NIX, D. E.; BALLOU, C. H. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 1073-1081, 1993.

FREITAS, G. C.; CARREGARO, A. B. Aplicabilidade da extrapolação alométrica em protocolos terapêuticos para animais selvagens. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, p. 297-304, 2013.

FUKUDA, H.; HIRAMATSU, K. Primary targets of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.43, p. 410-2, 1999.

FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.

GAIOLLA, P. S. A.; COELHO, L. S.; DE SOUZA CAVALCANTE, R. **Protocolo de atendimento aos pacientes com infecção do trato respiratório inferior**. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2015.

GOODWIN, S. D.; GALLIS, H. A.; CHOW, A. T.; WONG, F. A.; FLOR, S. C.; BARTLETT, J. A. Pharmacokinetics and safety of levofloxacin in patients with human immunodeficiency virus infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 38, n. 4, p. 799-804, 1994.

GOUDAH, A. Pharmacokinetics of levofloxacin in male camels (*Camelus dromedarius*). **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 32, n. 3, p. 296-299, 2009.

GOUDAH, A.; ABO EL-SOUD, K.; SHIM, J. H.; SHIN, H. C.; ABD EL-ATY, A. M. Characterization of the pharmacokinetic disposition of levofloxacin in stallions after intravenous and intramuscular administration. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 31, n. 5, p. 399-405, 2008.

GOUDAH, A.; ABO-EL-SOUD, K. Pharmacokinetics, urinary excretion and milk penetration of levofloxacin in lactating goats. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 32, n. 1, p. 101-104, 2009.

GOUDAH, A.; HASABELNABY, S. Disposition kinetics of levofloxacin in sheep after intravenous and intramuscular administration. **Veterinary medicine international**, v. 2010, 2010.

GRABE, M.; BJERKLUND-JOHANSEN, T. E.; BOTTO, H.; CEK, M.; et al. **Guía clínica sobre las infecciones urológicas**. Asociación Europea de Urología, p. 1290-423, 2010.

HADDAD, N. S.; PEDERSOLI, W. M.; RAVIS, W. R.; FAZELI, M. H.; CARSON J.R. Combined pharmacokinetics of gentamicin in pony mares after a single intravenous and intramuscular administration. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 9, p. 2004-2007, 1985.

HOOPER, D. C.; JACOBY, G. A. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, p.025320, 2016.

HOOPER, D.C. Mode of action of fluoroquinolones. **Drugs**, v. 58, supl. 2, p. 6-10, 1999.

IDDEX. Microbiology guide to interpreting minimum inhibitory concentration (MIC), 2019. Disponível em: <https://www.idexx.com/files/microbiology-guide-interpreting-mic.pdf>. Acessado em: 20 de outubro de 2020.

LODE, H.; BORNER, K.; KOEPPE, P. Pharmacodynamics of fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 33-39, 1998.

LODISE, T. P.; DRUSANO, G. L. Pharmacokinetics and pharmacodynamics: optimal antimicrobial therapy in the intensive care unit. **Critical care clinics**, v. 27, n. 1, p. 1-18, 2011.

LUO, W.; CHEN, D.; WU, M.; LI, Z., et al. Pharmacokinetics/Pharmacodynamics models of veterinary antimicrobial agents. **Journal of veterinary science**, v. 20, n. 5, 2019.

MARTINS, E.S. **Farmacocinética do efavirenz administrado na forma de micropartículas inorgânicas em coelhos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, São Paulo, 2018.

MORRISSEY, I.; GEORGE, J.T. Purification of pneumococcal type II topoisomerases and inhibition by gemifloxacin and other quinolones. **AntimicrobChemother**, v.45, suppl. S1, p. 101-6, 2000.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999.

NOEL, G. J. A review of levofloxacin for the treatment of bacterial infections. **Clinical Medicine. Therapeutics**, v. 1, p. 433–458, 2009.

ONE HEALTH. American Veterinary Medical Association, 2020. Disponível em: <https://www.avma.org/resources-tools/one-health>. Acesso em: 04 de janeiro de 2021.

ONUFRACK, N. J.; FORREST, A.; GONZALEZ, D. Pharmacokinetic and pharmacodynamic principles of anti-infective dosing. **Clinical therapeutics**, v. 38, n. 9, p. 1930-1947, 2016.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for

detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PAPICH, M. G. Pharmacokinetic–pharmacodynamic (PK–PD) modeling and the rational selection of dosage regimes for the prudent use of antimicrobial drugs. **Veterinary Microbiology**, v. 171, n. 3-4, p. 480-486, 2014.

PAPICH, M. G.; VAN CAMP, S. D.; COLE, J. A.; WHITACRE, M. D. Pharmacokinetics and endometrial tissue concentrations of enrofloxacin and the metabolite ciprofloxacin after iv administration of enrofloxacin to mares. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 25, n. 5, p. 343-350, 2002.

PEYROU, M.; BOUSQUET-MELOU, A.; LAROUTE, V.; VRINS, A.; DOUCET, M. Y. Enrofloxacin and marbofloxacin in horses: comparison of pharmacokinetic parameters, use of urinary and metabolite data to estimate first-pass effect and absorbed fraction. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 29, n. 5, p. 337-344, 2006.

PILTCHER, O. B.; KOSUGI, E. M.; SAKANO, E.; et al. Como evitar o uso inadequado de antibióticos nas infecções de vias aéreas superiores? Posição de um painel de especialistas. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 84, n. 3, p. 265-279, 2018.

PRESTON, S. L.; DRUSANO, G. L.; BERMAN, A. L. Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trials. **Jama**, v. 279, n. 2, p. 125-129, 1998.

RIDDLE, C.; LEMONS, C. L.; PAPICH, M. G.; ALTIER, C. Evaluation of ciprofloxacin as a representative of veterinary fluoroquinolones in susceptibility testing. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1636-1637, 2000.

RIVOIRE, N.; RAVOLOLONANDRIANA P.; RASOLONAVALONA, T.; MARTIN, A.; PORTAELS, F.; RAMAROKOTO, H.; RAZANAMPARANY, V.R. Evaluation of the resazurin assay for the detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Madagascar. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 11, n. 6, p. 683-688, 2007.

ROBERTS, J. A.; BIOMÉRIEUX. Antimicrobial prescribing: optimization through drug dosing and MIC, 2018. Disponível em: <https://www.biomerieux-microbio.com/education/antimicrobial-prescribing-optimization-through-drug-dosing-and-mic/>. Acessado em: 20 de outubro de 2020.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, p. 321-324, 2007.

- SHARMA, P. C.; JAIN, A.; JAIN, S. Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, Microbiology and therapeutic prospects. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 66, n. 6, p. 587-604, 2009.
- TANG-LIU, D. D. S.; WILLIAMS, R. L.; RIEGELMAN, S. Nonlinear theophylline elimination. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 31, n. 3, p. 358-369, 1982.
- TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Plasma Clearance. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 415-25, 2004a.
- TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Plasma terminal half-life. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 427-39, 2004b.
- TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Volumes of distribution. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 441-53, 2004c.
- TOUTAIN, P. L.; BOUESQUET-MÉLOU, A. **Bioavailability and its assessment.** **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 455-466, 2004d.
- TOUTAIN, P. L.; DEL CASTILLO, J. R.; BOUSQUET-MÉLOU, A. The pharmacokinetic–pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. **Research in veterinary science**, v. 73, n. 2, p. 105-114, 2002.
- WENZLER, E. Applying Fluoroquinolone Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Updated Clinical Breakpoints for Gram-Negative Pathogens to Determine Optimal Dosing, **AST News Update - CLSI**, v. 4, n. 1, 2019. <https://n.org/about/blog/ast-news-update-2019-featured-article/>
- WONG, F. A.; JUZWIN, S. J.; FLOR, S. C. Rapid stereospecific high-performance liquid chromatographic determination of levofloxacin in human plasma and urine. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 15, n. 6, p. 765-771, 1997.
- WRIGHT, D. H.; BROWN, G. H.; PETERSON, M. L.; ROTSCHAFFER, J. C. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 669-683, 2000.
- YAMARIK, T. A.; WILSON, W. D.; WIEBE, V. J.; PUSTERLA, N.; EDMAN, J.; PAPICH, M. G. Pharmacokinetics and toxicity of ciprofloxacin in adult horses. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**. v. 33, p. 587–594, 2010.
- YU, Y.; ZHOU, Y. F.; SUN, J.; SHI, W.; LIAO, X. P.; LIU, Y. H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of sarafloxacin against avian pathogenic Escherichia coli in Muscovy ducks. **BMC veterinary research**, v. 13, n. 1, p. 47, 2016.

ZELENITSKY, S. A.; ARIANO, R. E. Support for higher ciprofloxacin AUC₂₄/MIC targets in treating Enterobacteriaceae bloodstream infection. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1725-1732, 2010.

ZHOU, Z. L.; YANG, M.; YU, X. Y.; et al. A rapid and simple high-performance liquid chromatography method for the determination of human plasma levofloxacin concentration and its application to bioequivalence studies. **Biomedical Chromatography**, v. 21, n. 10, p. 1045-1051, 2007.

ANEXO I



ATESTADO

Atesto que o Projeto "AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DE LEVOFLOXACINA EM EQUINOS E CONSTRUÇÃO DO REGIME POSOLÓGICO" **Protocolo CEUA 0264/2018**, a ser conduzido por Carlos A. Hussni / Rosângela G. Peccinini, responsável/orientador Rosângela Gonçalves Peccinini, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	01/03/2019 a 01/03/2022
Nome Comum / Espécie / Linhagem	EQUINA / EQUUS CABALLUS /
Raça	mestiços
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	6
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0350
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	7 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	aquisição/plantel próprio da UNESP

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 16/01/2019

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO II

09/10/2021 11:16

E-mail de Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - [JPPS] Submission Acknowledgement 32065



Evelin Dos Santos Martins Teodoro <evelin.martins@unesp.br>

[JPPS] Submission Acknowledgement 32065

1 mensagem

Fakhreddin Jamali, Editor-in-Chief <fjamali@ualberta.ca>
Para: Evelin dos Santos Martins <evelin.martins@unesp.br>

8 de outubro de 2021 09:18

Dear Dr. Evelin dos Santos Martins:

Please note that under the REVIEW link, you may find statements implying that the process has not been initiated, or no editor has been assigned. The statement is for internal use only as the manuscript may already be in the hand of the editor and being reviewed.

Thank you for submitting the manuscript, "Determination of levofloxacin in equine plasma and peritoneal fluid by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry" to the Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL: <https://journals.library.ualberta.ca/jpps/index.php/JPPS/authorDashboard/submission/32065>
Username: evelinsmartins

Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Fakhreddin Jamali, Editor-in-Chief