

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS ARAÇATUBA**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DO  
FLORFENICOL EM PLASMA BOVINO APÓS  
APLICAÇÃO INTRAMUSCULAR DE DUAS DOSES E  
AVALIAÇÃO DA SUA EFICÁCIA A BACTÉRIAS  
SENSÍVEIS**

**Luís Gustavo Rodrigues Pelissoni**

Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS ARAÇATUBA**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DO  
FLORFENICOL EM PLASMA BOVINO APÓS  
APLICAÇÃO INTRAMUSCULAR DE DUAS DOSES E  
AVALIAÇÃO DA SUA EFICÁCIA A BACTÉRIAS  
SENSÍVEIS**

**Luís Gustavo Rodrigues Pelissoni**

**Orientador: Prof. Adj. Luiz Cláudio Nogueira Mendes**

Dissertação apresentada a Faculdade de  
Medicina Veterinária – Unesp, Campus de  
Araçatuba, para obtenção do título de  
Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia  
Médica Cirúrgica)

ARAÇATUBA – SP

2013

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Pelissoni, Luís Gustavo Rodrigues

P384a            avaliação do perfil farmacocinético do florfenicol em plasma  
                  bovino após aplicação intramuscular de duas doses e avaliação da sua  
                  eficácia a bactérias sensíveis/ Luís Gustavo Rodrigues Pelissoni.  
Araçatuba: [s.n], 2013  
51f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) –Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Medicina Veterinária, 2013  
Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Nogueira Mendes

1. Farmacologia Clínica 2. Farmacocinética 3. Testes de Sensibilidade  
Microbiana

CDD 636.0895

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**LUÍS GUSTAVO RODRIGUES PELISSONI** – nascido em Jales, SP, em 21 de agosto de 1981. Residente em Campinas – SP. Médico Veterinário graduado pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, campus Araçatuba, Araçatuba, SP em dezembro de 2004, com especialização em Gestão de Projetos pela Anhanguera Educacional em agosto de 2010. Chefe de Registro de Produtos na Vétuquinol-Fagra. Aluno de pós-graduação em Ciência Animal – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – FMVA – Curso de Medicina Veterinária – Campus Araçatuba.

## Epígrafe

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um  
pode começar agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

## Dedicatória

Dedico esse mestrado aos meus pais que sempre me incentivaram a estudar e que sempre foram decisivos em minhas escolhas.

A minha esposa, Adriane, que incentivou o meu retorno aos estudos e que não me deixou desistir da conclusão desta etapa.

Aos meus amigos, Marcos e Nize, que me acolheram durante esse tempo em sua residência me dando o suporte necessário para a realização do mestrado.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Professor Luiz Cláudio N. Mendes por ter me dado esta oportunidade, por sua orientação e pela paciência que teve comigo ao longo desse mestrado.

Ao Professor Francisco Leydson F. Feitosa por ter me incentivado a entrar no programa de mestrado e pela ajuda e atenção durante os quase dois anos de mestrado.

A minha esposa Adriane, primeiramente por ter me encorajado a retornar aos estudos e posteriormente por ter me ajudado na revisão e estruturação da dissertação.

E finalmente a empresa Ceva Saúde Animal que patrocinou a realização do projeto; sem ela não seria possível a conclusão desta etapa.

## SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1.....	12
1. Introdução.....	12
2. Florfenicol.....	15
3. Farmacocinética e Farmacodinâmica.....	18
4. Objetivo.....	21
Referências.....	22
CAPÍTULO 2.....	25
Artigo Científico.....	26

## AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DO FLORFENICOL EM PLASMA BOVINO APÓS APLICAÇÃO INTRAMUSCULAR DE DUAS DOSES E AVALIAÇÃO DA SUA EFICÁCIA A BACTÉRIAS SENSÍVEIS

**RESUMO** - O florfenicol é um antibiótico utilizado para o tratamento de doença respiratória em bovinos. Estudar e compreender a sua farmacocinética são ferramentas importantes para o controle eficaz e adequado dessas enfermidades, minimizando assim o aparecimento de cepas bacterianas resistentes. Por isso, este estudo teve por objetivo determinar o perfil farmacocinético do florfenicol em plasma bovino após aplicação intramuscular de duas doses e avaliar a sua eficácia contra bactérias sensíveis. No estudo, foram utilizados 8 bovinos que receberam duas aplicações de florfenicol por via intramuscular e na posologia de 20 mg/Kg com intervalo de 48 horas. A concentração plasmática foi determinada por cromatografia líquida de alta performance acoplada a um espectrofotômetro de massa. A concentração inibitória mínima foi realizada em um laboratório veterinário seguindo os padrões internacionais do Clinical and Laboratory Standard Institute. Os parâmetros farmacocinéticos calculados foram:  $C_{max} = 1,21 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ ,  $T_{max} = 3,43 \pm 2,23 \text{ h}$ ,  $AUC_{0-t} = 34,16 \pm 4,50 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ ,  $T_{1/2} = 63,46 \pm 23,76 \text{ h}$ ; e  $C_{max} = 1,17 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$ ;  $T_{max} = 6,00 \pm 0,00 \text{ h}$ ;  $AUC_{0-t} = 52,37 \pm 5,50 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ ;  $T_{1/2} = 77,74 \pm 43,65 \text{ h}$ , respectivamente para a primeira e segunda aplicação. Os níveis de florfenicol no plasma mantiveram-se acima da concentração inibitória mínima para as bactérias: *Mannheimia haemolytica* (0,75  $\mu\text{g/mL}$ ), *Pasteurella multocida* tipo capsular A (0,75  $\mu\text{g/mL}$ ) e *Histophilus sommus* (0,30  $\mu\text{g/mL}$ ). Estes resultados comprovam a eficácia do florfenicol contra bactérias que causam a doença respiratória dos bovinos.

**PALAVRAS-CHAVES:** Farmacologia Clínica, Farmacocinética, Testes de Sensibilidade Microbiana

**EVALUATION OF PHARMACOKINETIC PROFILE OF FLORFENICOL IN  
BOVINE PLASMA AFTER APPLICATION OF TWO DOSES  
INTRAMUSCULAR AND EVALUATION OF ITS EFFECTIVENESS A  
SENSITIVE BACTERIA**

**Summary** - The florfenicol is an antibiotic used for the treatment of respiratory disease in cattle. Study and understand its pharmacokinetics are important tools for effective control of these diseases and appropriate, thereby minimizing the appearance of resistant bacterial strains. Therefore, this study aimed to determine the pharmacokinetic profile of florfenicol in bovine plasma after intramuscular injection of two doses and evaluate their effectiveness against susceptible bacteria. In the study, we used eight cattle that received two applications of florfenicol and intramuscularly at a dose of 20 mg/kg at intervals of 48 hours. The plasma concentration was determined by high performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer. The minimum inhibitory concentration was performed in a veterinary laboratory following the international standards of the Clinical and Laboratory Standards Institute. Pharmacokinetic parameters were calculated:  $C_{max} = 1.21 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$ ,  $T_{max} = 3.43 \pm 2.23 \text{ h}$ ,  $AUC_{0-t} = 34.16 \pm 4.50 \text{ h}\cdot\mu\text{g/mL}$ ,  $T_{1/2} = 63.46 \pm 23.76 \text{ h}$ , and  $C_{max} = 1.17 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$ ,  $T_{max} = 6.00 \pm 0.00 \text{ h}$ ,  $AUC_{0-t} = 52.37 \pm 5.50 \text{ h}\cdot\mu\text{g/mL}$ ,  $T_{1/2} = 77.74 \pm 43.65 \text{ h}$ , respectively for the first and second application. The florfenicol levels in plasma remained above the minimum inhibitory concentration for bacteria: *Mannheimia haemolytica* (0.75  $\mu\text{g/mL}$ ), *Pasteurella multocida* capsular type A (0.75  $\mu\text{g/mL}$ ) and *Histophilus sommus* (0.30  $\mu\text{g/mL}$ ). These results indicate the effectiveness of florfenicol against bacteria that cause respiratory disease of cattle.

**Keywords:** Clinical Pharmacology, Pharmacokinetics, Microbial Sensitivity Tests

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **1. Introdução**

Os países em desenvolvimento vêm apresentando um aumento da produção de produtos de origem animal para satisfazer o mercado interno e também visando o aumento de suas exportações. Esses países, devido a pressão globalizante da economia, devem apresentar melhorias constantes nos índices produtivos, sob pena, em caso contrário, de situarem-se num patamar inferior de desenvolvimento econômico. O aumento do fornecimento de produtos primários devido ao apetite crescente da população urbana para o leite, carne e ovos, leva ao crescimento econômico, que muitas vezes por ser pouco planejado, ocasiona danos ambientais, distúrbios da agricultura familiar e incertezas entre os produtores e consumidores. Esta situação chama pela necessidade de novas políticas de produção animal em termos de alimento saudável, boas práticas de produção animal e conservação ambiental (BELLAVÉR, 2000).

Atualmente, o Brasil é um dos principais líderes mundiais na produção de alimentos de origem animal, possuindo o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com 212,8 milhões de cabeças, além de 39,3 milhões de cabeças de suínos, 17,6 milhões de ovinos e 9,3 milhões de caprinos. O efetivo total de galináceos (galinhas, galos, frangos, frangas, pintos) foi, em 2011, de 1,266 bilhão de unidades de acordo com fontes apresentadas pelo IBGE, 2012. Em decorrência deste fato, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) vêm aumentando as exigências, no que tange a produção de produtos farmacêuticos e biológicos destinado para o uso em animais (companhia ou de produção), com o objetivo de garantir um nível adequado de proteção aos animais, à saúde humana e ao meio ambiente.

Os antimicrobianos, junto com os endectocidas e ectoparasiticidas, constituem, atualmente, o grupo de drogas mais comumente utilizadas na clínica de grandes animais (RADOSTITS et al., 2002). A antibioticoterapia, na medicina veterinária e humana, é usualmente utilizada como a primeira opção no tratamento de diversas patologias de origem bacteriana. Atualmente, existe no mercado uma grande variedade de princípios ativos, que atuam de diferentes maneiras nas bactérias; assim, é de extrema importância avaliar e conhecer a eficácia desses fármacos frente a estes diversos microrganismos.

Segundo Spinosa (2006), os antimicrobianos são agentes químicos usados para combater os microrganismos, podendo ser divididos em duas categorias: os inespecíficos e específicos. Os antimicrobianos inespecíficos atuam sobre microrganismos em geral (bactérias/fungos/vírus) quer sejam patogênico ou não; pertencem a esse grupo os desinfetantes e antissépticos. Os antimicrobianos específicos atuam sobre microrganismos responsáveis pelas doenças infecciosas que acometem os animais e seres humanos e são os quimioterápicos e os antibióticos. Os quimioterápicos são substâncias químicas produzidas por meio de síntese laboratorial, que quando introduzida no animal por via enteral ou parenteral age de maneira seletiva sobre o agente causador do processo infeccioso, são exemplos: às sulfas, trimetropim e análogos, quinolonas, derivados nitrofuranos e metronidazol. Os antibióticos são substâncias produzidas por microrganismos que têm a capacidade em pequenas doses de inibir o crescimento ou destruir os microrganismos causadores de doenças e podem ser divididos em:

- Antibióticos: substâncias químicas (medicamentos) produzidas por microrganismos ou seus equivalentes;
- Antibióticos biossintéticos: são produzidos a partir de cultura de microrganismos, na qual são acrescentadas substâncias químicas capazes de alterar a estrutura molecular do antibiótico em produção;

- Antibióticos semissintéticos: são obtidos em laboratório acrescentando radicais químicos ao núcleo ativo de um antibiótico isolado de um meio de cultura, no qual cresce um microrganismo;
- Sintobióticos: antibióticos produzidos exclusivamente por síntese laboratorial, porém a partir do estudo dos precursores obtidos por microrganismos.

Com o aumento do rebanho nacional e o consumo de medicamentos destinados aos animais, foi aprovado a Instrução Normativa nº 26 em 9 de julho de 2009 (Regulamento Técnico para a Fabricação, Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário). Esta instrução abrange e regulamenta os estudos que devem ser realizados para os produtos antimicrobianos como: eficácia, segurança e período de carência (MAPA, 2009).

Os estudos de eficácia são conduzidos com o objetivo de comprovar que os produtos antimicrobianos de uso veterinário possui eficácia contra os agentes etiológicos indicados, na posologia recomendada e espécie(s) animal(is) preconizadas. Os estudos são realizados *in vivo* com animais infectados naturalmente ou experimentalmente em condições controladas; ou por meio de estudos de biodisponibilidade plasmática (perfil farmacocinético), com animais saudáveis, realizando a correlação com CIM (Concentração Inibitória Mínima) e/ou CBM (Concentração Bactericida Mínima).

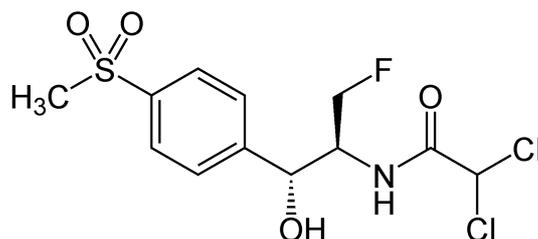
O estudo de segurança tem por objetivo assegurar que o produto veterinário, quando utilizado na posologia recomendada não causará danos e/ou efeitos adversos para as espécies alvos. Esses estudos devem ser acompanhados por intermédios de exames laboratoriais, em momento anterior e posterior ao tratamento, sendo os números de amostras justificadas estatisticamente. O período de carência é obtido através de um estudo de resíduo que acompanha a depleção do ativo nas matrizes biológicas (fígados, rim, músculo, gordura, leite e ovos). Esse estudo tem que ser feito em todas as

espécies alvos indicadas na bula, na maior posologia (quando existir mais de uma) e em todas as matrizes de interesse. Os LMRs (Limites Máximos de Resíduos) utilizados deverá seguir o estabelecido pelo CODEX ALIMENTARIUS, porém em sua ausência, poderão ser utilizados os LMR's de outros órgãos internacionais (MAPA, 2009).

## 2. O Florfenicol

O uso indiscriminado e constante dos antibióticos tem causado ao longo dos anos a resistência dos microrganismos; essa resistência se deve a diversos fatores como a inativação do fármaco por enzimas e modificações em seus receptores na célula, sendo o aparecimento desses fatores ligados a mutações, transdução, transformação e conjugação (VIANA, 2000). Devido à geração da resistência por parte das bactérias, inúmeros grupos de antibióticos e quimioterápicos foram desenvolvidos. O florfenicol é um antibiótico de uso exclusivo na medicina veterinária, derivado análogo do cloranfenicol; difere-se deste último pela presença de um grupo metilsulfônico e pela presença de um átomo de flúor localizado no agrupamento da função alcoólica primária (EMA, 1996).

O florfenicol é um antibiótico bacteriostático de amplo espectro indicado para bactérias gram negativas. O seu modo de ação é através da inibição da atividade da enzima peptidiltransferase do ribossomo 70 S (EMA, 1996 e SPINOSA, 2006). Sua indicação é para o tratamento de doenças respiratórias em bovinos causadas por *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus sommus*; diarreias causadas por *Escherichia coli*; pododermatites causada por *Bacteróides nodosus* e *Bacteroides melaninogenicus* e ceratoconjutivite infecciosa bovina causada por *Moraxella bovis*, sendo a dose recomendada de 20 mg/Kg pela via intramuscular a cada 48 horas (RADOSTITS et al., 2002).



**Figura 1** - Fórmula estrutural do florfenicol.

A eficácia *in vitro* do florfenicol foi demonstrada por Priebe e Schwarz (2003) que coletaram e isolaram 756 amostras de bactérias provenientes do trato respiratório de bovinos e suínos, durante os anos de 2000 e 2001 na Alemanha. As bactérias incluídas nesse estudo foram 122 de *Pasteurella multocida* e 118 de *Mannheimia haemolytica* provenientes de amostras coletadas de bovinos e 212 *P. multocida*, 45 *Actinobacillus pleuropneumoniae*, 160 *Bordetella bronchiseptica* e 99 *Streptococcus suis* provenientes de suínos. Essas bactérias foram isoladas e investigadas a sua susceptibilidade ao Florfenicol por dois métodos diferentes: (a) método de difusão em disco e (b) método de microdiluição. Os dados obtidos foram comparados com os dados inicialmente obtidos na introdução da molécula no mercado alemão. O estudo demonstrou que não houve o aparecimento de resistência pelas bactérias causadoras de doenças respiratória em bovinos e suínos, porém recomendou-se o monitoramento contínuo dessas bactérias para a determinação de sua sensibilidade ao florfenicol.

Segundo estudo conduzido por Ávila et al. (2009), onde se avaliou a eficácia do florfenicol em 12 bezerros machos da raça Holandesa, com idade entre 10 e 15 dias inoculados com  $10^9$  UFC (Unidade Formadora de Colônia) de *Salmonella typhimurium*, o florfenicol foi eficaz na redução da excreção fecal dessas bactérias e favoreceu na recuperação clínica dos sintomas causados pela bactéria. Os animais foram divididos em dois grupos: controle e tratado; sendo que os animais do grupo tratado receberam 3 doses de 20 mg/kg de florfenicol, por via intramuscular, com intervalo entre dose de 48 horas.

Inicialmente estudos para determinar a farmacocinética do florfenicol foram realizados em ratos e bovinos; foi observado que os perfis farmacocinéticos, para ambas as espécies, foram qualitativamente similares. Nos tecidos analisados foram identificados cinco metabólitos (florfenicol, florfenicol amina, florfenicol álcool, ácido oxâmico do florfenicol e monocloroflorfenicol). A principal via de eliminação foi a urina (63-71%), sendo que após a aplicação intramuscular a taxa de absorção foi de 75% (EMA, 1996). Em bovinos após a aplicação de duas injeções intramusculares de 20 mg de florfenicol C-14 por quilo de peso vivo, com 48 horas de intervalo, foram identificados metabólitos urinários, fecais e tissulares. O fármaco foi o principal componente urinário, representando aproximadamente 64% da amostra conjunta de 0 a 120 horas; os demais metabólitos urinários identificados foram: florfenicol amina (~8%), florfenicol álcool (~12%), ácido oxâmico do florfenicol (~12%) e monocloroflorfenicol (<2%) (ESPINASSE, 1994).

Estudos farmacocinéticos comparando a administração por via intramuscular e intravenosa foram realizados em bovinos (LOBELL et al., 1994) e em coelhos (KOC et al., 2009). Esses estudos demonstraram que o florfenicol quando aplicado pela via intramuscular apresenta uma absorção mais lenta, porém, uma meia vida plasmática menor quando comparado ao tratamento pela via intravenosa. Os animais tratados pela via intravenosa apresentaram uma ampla distribuição do florfenicol para os tecidos, porém apresentaram uma menor concentração plasmática. A farmacocinética do florfenicol também foi estudada concomitantemente a outros antibióticos como o tianfenicol (droga pertencente ao mesmo agrupamento químico do florfenicol); neste estudo conduzido por Lashev & Haritova (2006) comprovou, por meio de revisão dos dados de literatura, que os parâmetros farmacocinéticos do tianfenicol e do florfenicol são similares para as espécies domésticas, porém o florfenicol possui espectro de ação maior.

Estudos de depleção mostraram que após a aplicação do fármaco, altas concentrações são encontradas no fígado (30 dias após a aplicação) e no sítio

de injeção (30 dias após a aplicação) (EMA, 1996). Em estudos conduzidos com o produto comercial **NUFLOR**<sup>®</sup> (MSD Saúde Animal) em 25 bovinos da raça Hereford e cruza Hereford (12 novilhos e 13 novilhas), em duas injeções intramusculares na dose de 20 mg/kg de peso vivo, com 48 horas de intervalo entre as injeções, cinco animais foram sacrificados por grupo nos dias 5, 10, 20, 30 e 40 e tiveram coletadas amostras de fígado e determinada a concentração do florfenicol amina; a depleção foi linear no decorrer dos dias 10, 20, 30, com concentrações média de 8,11, 4,02 e 1,38 ppm, respectivamente; em função dos dados obtidos o período de carência ou período de retirada foi de 28 dias (ESPINASSE, 1994).

A realização de estudos de eficácia (*in vitro* e *in vivo*), segurança, resíduo e biodisponibilidade plasmática do antimicrobiano são essenciais para a determinação correta de sua dose e posologia.

### **3. Farmacocinética e Farmacodinâmica**

A farmacodinâmica (PD) é o mecanismo pelo qual o medicamento atua sobre as funções bioquímicas ou fisiológicas de um ser vivo; a relação dose-resposta é o estudo quantitativo dos efeitos biológicos e terapêuticos dos medicamentos. Os estudos farmacodinâmicos têm por objetivo entender os efeitos farmacológicos e adversos que os medicamentos podem causar nos seres vivos. O mecanismo de ação dos medicamentos pode ser dividido em dois grandes grupos: os estruturalmente inespecíficos e os estruturalmente específicos. O primeiro grupo possui efeito farmacológico provocando alterações nas propriedades físico-químicas, acarretando mudanças em mecanismos importantes das funções celulares e levando a desorganização de uma série de processos metabólicos, enquanto que o segundo grupo age ligando-se a receptores, isto é, macromoléculas existentes no organismo, formando um complexo que leva a uma determinada alteração na função celular (SPINOSA, 2006).

A farmacocinética (PK) é o estudo do movimento de uma substância química e/ou medicamento no interior do organismo vivo, ou seja, é o processo de absorção, distribuição, biotransformação e excreção. A absorção é uma série de processos pelos quais uma substância/medicamento penetra no organismo sem lesão traumática. Porém, para que ocorra a absorção é necessário que a substância/medicamento atravesse diversas membranas biológicas, como o epitélio gastrintestinal, o endotélio vascular, além das membranas plasmáticas. Para isso é importante conhecer as membranas celulares, o pH do meio do fármaco e o pK (constante de dissociação) do medicamento (SPINOSA, 2006).

O efeito de um tratamento antimicrobiano é o resultado da dinâmica que envolve a interação de três fatores principais: o hospedeiro, a droga e o microrganismo infeccioso. O PK é o que o hospedeiro faz com a droga, isto é, a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (GREKO, 2003). O PD é o efeito da droga em função de sua concentração e por último o microrganismo, onde o efeito é demonstrado pela morte ou inibição de seu crescimento. Muitos estudos sobre as relações de PK/PD dos antimicrobianos são essencialmente desenhados para explicar como a concentração da droga atua sobre os microrganismos, sendo utilizados como parâmetros para definirem a eficácia ou ineficácia do produto.

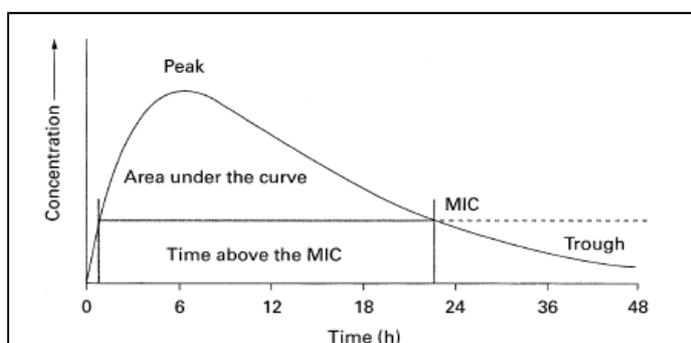
A grande maioria dos regimes de doses correntemente utilizados para ação contra microrganismos é desenhada com o objetivo de manter o nível plasmático da droga acima da concentração mínima necessária para inibir o crescimento do patógeno alvo (LEES e ALIABADI, 2002). A ótima dose e intervalo de doses maximizaria o efeito enquanto minimizaria o risco de efeitos adversos tais como resistência, toxicidade e, para animais de produção, diminuição do período de carência do produto utilizado (GREKO, 2003). Segundo Graig (1998), os resultados destes estudos indicam que os antibióticos podem ser divididos dentro de dois grandes grupos (tabela 1): aqueles que matam os microrganismos, sendo dependentes da concentração e

que apresentam efeitos persistentes e prolongados; e aqueles que exibem a característica de matar os microrganismos, sendo dependentes do tempo e que exibem efeitos com persistência mínima ou moderada. Para as drogas que caem dentro do primeiro grupo (aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, metronidazole e cetolídeos) a área sobre a curva (AUC) e  $C_{max}$  (pico da concentração máxima) em relação ao CIM (AUC/CIM e  $C_{max}/CIM$ ) são os principais índices de PK/PD correlacionados com a eficácia do produto (Figura 2). Já aquelas drogas que exibem sua ação dependente do tempo, o parâmetro que mede o tempo em que a concentração plasmática da droga fica acima do CIM ( $T > CIM$ ) é o principal parâmetro que determina a eficácia. Esta última característica diz respeito ao antibiótico estudado. No trabalho de PRATS e colaboradores (2005) os autores recomendam que para um antibiótico seja eficaz esse deve apresentar uma  $T > CIM$  de no mínimo 50%.

**Tabela 1-** Parâmetros da farmacocinética e farmacodinâmica correlacionados com a eficácia.

T > CIM	AUC <sub>24h</sub> /CIM e $C_{max}/CIM$
Penicilinas	Aminoglicosídeos
Cefalosporinas	Fluoroquinolonas
Macrolídeos	Metronidazole
Clindamicina	Daptomicina
Oxazolidinonas	Cetolídeos
Glicilcilines	Azitromicina
Doxiciclina	Streptograminas
	Glycopeptídeos
	Tetraciclina

Fonte: BAMBEKE e TULKENS, 2001.



**FIGURA 2** - Pico/CIM, AUC<sub>24h</sub>/CIM e T>CIM, os três principais parâmetros farmacocinéticos relacionados com a eficácia dos antibióticos.

A correlação entre o perfil farmacocinético da droga/ativo com o seu o seu CIM são parâmetros importantes para determinar a sua eficácia frentes a bactérias e um meio de se evitar o aparecimento de cepas resistentes.

#### 4. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi determinar, em bovinos, o perfil farmacocinético e a concentração plasmática eficaz para cada agente etiológico susceptível ao florfenicol após a administração intramuscular do fármaco na posologia de 20 mg/Kg com intervalo de 48 horas, comparando os resultados obtidos com os estudos *in vitro* para a determinação do CIM e CBM.

## REFERÊNCIAS

ÁVILA, L.G. et. al. – **Avaliação da eficácia do florfenicol no tratamento de bezerros infectados experimentalmente com *Salmonella thyphimurium*.**

Ciência Animal Brasileira, suplemento I, p. 469-473, 2009.

BAMBEKE, F. V., TULKENS, P. M. - **Macrolides: pharmacokinetics and pharmacodynamics.** International Journal of Antimicrobial Agents 18:s17-s23, 2001.

BELLAVER, C. – **O uso de microingredientes (aditivos) na formulação de dietas para suínos e suas implicações na produção e segurança alimentar.** Congresso Mercosur de Producción Porcina, Argentina, 2000.

EMA – European Medicines Agency – **Florfenicol: summary report (1) – committee for veterinary products** – 1996.

ESPINASSE, J. – **Simpósio internacional sobre doença respiratória bovina** – XVIII Congresso Mundial de Buiatria, 1994.

CRAIG, W. A. - **Choosing an antibiotic on the basis of pharmacodynamics.** Ear, Nose, Throat Journal 77 (suppl.6):7-11, 1998.

GREKO, C. - **Tissue cages in calves for studies on Pharmacokinetic/Pharmacodynamic relationships of antimicrobials.** Doctoral thesis: Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. 61p, 2003.

IBGE – **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, v. 39 2011. Rio de Janeiro – RJ. IBGE, 2012. 60p.

KOC, F. et al – **Pharmacokinetics of florfenicol after intravenous and intramuscular administration in New Zealand White rabbits.** Research in Veterinary Science, v.87, p.102-105, 2009.

LASHEV, L., HARITOVA, A. – **Comparative allometric analysis of pharmacokinetics of florfenicol and tiamphenicol.** Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, v. 9, n. 2, p. 115-122, 2006.

LEES, P and ALIABADI, F. S. - **Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans.** International journal of antimicrobial agents 19:269-284, 2002.

LOBELL, R. D. et. al. - **Pharmacokinetics of florfenicol following intravenous and intramuscular doses to cattle.** Journal Veterinary Pharmacology 4:253-258, 1994.

MAPA - **Regulamento Técnico Para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário, Instrução Normativa nº26, de 9 de julho de 2008.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

PRIEBE, S., SCHWARZ, S. – **In vitro activities of florfenicol against bovine and porcine respiratory tract pathogens.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.47, n.8, p. 2703-2705, 2003.

RADOSTITS, O. M. et al – **Clínica veterinária um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos.** 9º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, Maria M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

VIANA, F. A. B. – **Fundamentos de terapêutica veterinária** – Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.

## **CAPÍTULO 2 – TÍTULO DO TRABALHO**

### **AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DO FLORFENICOL EM PLASMA BOVINO APÓS APLICAÇÃO INTRAMUSCULAR DE DUAS DOSES E AVALIAÇÃO DA SUA EFICÁCIA A BACTÉRIAS SENSÍVEIS.**

Luís Gustavo Rodrigues Pelissoni<sup>1</sup>

\*autor correspondente

e-mail: [luiz.pelissoni@gmail.com](mailto:luiz.pelissoni@gmail.com)

Jefferson Figueira Alcindo<sup>1</sup>

e-mail: [jefferson.alcindo@yahoo.com.br](mailto:jefferson.alcindo@yahoo.com.br)

Francisco Leydson Formiga Feitosa<sup>1</sup>

e-mail: [leydsonf@fmva.unesp.br](mailto:leydsonf@fmva.unesp.br)

Juliana Regina Peiró<sup>1</sup>

e-mail: [jpeiro@fmva.unesp.br](mailto:jpeiro@fmva.unesp.br)

Otávio Luiz Fidelis Junior<sup>1</sup>

e-mail: [otaluf@gmail.com](mailto:otaluf@gmail.com)

Luiz Claudio Nogueira Mendes<sup>1</sup>

e-mail: [luizclaudiomendes@gmail.com](mailto:luizclaudiomendes@gmail.com)

1 Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) – Araçatuba, São Paulo, Brasil

## RESUMO

O florfenicol é um antibiótico utilizado para o tratamento de doença respiratória em bovinos. Estudar e compreender a sua farmacocinética são ferramentas importantes para o controle eficaz e adequado dessas enfermidades, minimizando assim o aparecimento de cepas bacterianas resistentes. Por isso, este estudo teve por objetivo determinar o perfil farmacocinético do florfenicol em plasma bovino após aplicação intramuscular de duas doses e avaliar a sua eficácia contra bactérias sensíveis. No estudo, foram utilizados 8 bovinos que receberam duas aplicações de florfenicol por via intramuscular e na posologia de 20 mg/Kg com intervalo de 48 horas. A concentração plasmática foi determinada por cromatografia líquida de alta performance acoplada a um espectrofotômetro de massa. A concentração inibitória mínima foi realizada em um laboratório veterinário seguindo os padrões internacionais do Clinical and Laboratory Standard Institute. Os parâmetros farmacocinéticos calculados foram:  $C_{\max} = 1,21 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ ,  $T_{\max} = 3,43 \pm 2,23 \text{ h}$ ,  $AUC_{0-t} = 34,16 \pm 4,50 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ ,  $T_{1/2} = 63,46 \pm 23,76 \text{ h}$ ; e  $C_{\max} = 1,17 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$ ;  $T_{\max} = 6,00 \pm 0,00 \text{ h}$ ;  $AUC_{0-t} = 52,37 \pm 5,50 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ ;  $T_{1/2} = 77,74 \pm 43,65 \text{ h}$ , respectivamente para a primeira e segunda aplicação. Os níveis de florfenicol no plasma mantiveram-se acima da concentração inibitória mínima para as bactérias: *Mannheimia haemolytica* (0,75  $\mu\text{g/mL}$ ), *Pasteurella multocida* tipo capsular A (0,75  $\mu\text{g/mL}$ ) e *Histophilus sommus* (0,30  $\mu\text{g/mL}$ ). Estes resultados comprovam a eficácia do florfenicol contra bactérias que causam a doença respiratória dos bovinos.

**PALAVRAS-CHAVES:** Farmacologia Clínica, Farmacocinética, Teste de Sensibilidade Microbiana

## ABSTRACT

The florfenicol is an antibiotic used for the treatment of respiratory disease in cattle. Study and understand its pharmacokinetics are important tools for effective control of these diseases and appropriate, thereby minimizing the appearance of resistant bacterial strains. Therefore, this study aimed to determine the pharmacokinetic profile of florfenicol in bovine plasma after intramuscular injection of two doses and evaluate their effectiveness against susceptible bacteria. In the study, we used eight cattle that received two applications of florfenicol and intramuscularly at a dose of 20 mg/kg at intervals of 48 hours. The plasma concentration was determined by high performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer. The minimum inhibitory concentration was performed in a veterinary laboratory following the international standards of the Clinical and Laboratory Standards Institute. Pharmacokinetic parameters were calculated:  $C_{max} = 1.21 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$ ,  $T_{max} = 3.43 \pm 2.23 \text{ h}$ ,  $AUC_{0-t} = 34.16 \pm 4.50 \text{ h}\cdot\mu\text{g/mL}$ ,  $T_{1/2} = 63.46 \pm 23.76 \text{ h}$ , and  $C_{max} = 1.17 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$ ,  $T_{max} = 6.00 \pm 0.00 \text{ h}$ ,  $AUC_{0-t} = 52.37 \pm 5.50 \text{ h}\cdot\mu\text{g/mL}$ ,  $T_{1/2} = 77.74 \pm 43.65 \text{ h}$ , respectively for the first and second application. The florfenicol levels in plasma remained above the minimum inhibitory concentration for bacteria: *Mannheimia haemolytica* (0.75  $\mu\text{g/mL}$ ), *Pasteurella multocida*, capsular type A (0.75  $\mu\text{g/mL}$ ) and *Histophilus sommus* (0.30  $\mu\text{g/mL}$ ). These results indicate the effectiveness of florfenicol against bacteria that cause respiratory disease of cattle.

**Keywords:** Clinical Pharmacology, Pharmacokinetics, Microbial Sensitivity Tests

## INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são agentes químicos usados para combater os microrganismos, podendo ser divididos em duas categorias: os inespecíficos e específicos. Os antimicrobianos inespecíficos atuam sobre microrganismos em geral (bactérias/vírus/fungos) quer sejam patogênicos ou não; pertencem a esse grupo os desinfetantes e antissépticos. Os antimicrobianos específicos atuam sobre os microrganismos responsáveis pelas doenças infecciosas que acometem os animais e seres humanos e são classificados em: quimioterápicos e antibióticos (SPINOSA, 2006).

Os quimioterápicos são substâncias químicas produzidas por meio de síntese laboratorial, que quando introduzidas no animal por via enteral ou parenteral agem de maneira seletiva sobre o agente causador do processo infeccioso; são exemplos de quimioterápicos: as sulfas, trimetopim e análogos, quinolonas, derivados nitrofuranos e metronidazol. Os antibióticos são substâncias produzidas por microrganismos que possuem a capacidade, em pequenas doses, de inibir o crescimento ou de destruir os microrganismos causadores de doenças; podem ser divididos em: 1) antibióticos - substâncias químicas produzidas por microrganismos ou equivalentes; 2) antibióticos biossintéticos - produzidos a partir de cultura de microrganismos, na qual são acrescentadas substâncias químicas capazes de alterar a estrutura molecular do antibiótico em produção; 3) antibióticos semissintéticos - obtidos em laboratórios acrescentando radical químico ao núcleo ativo de um antibiótico isolado um meio de cultura, no qual cresce um microrganismo; 4) simbióticos - produzidos exclusivamente por síntese laboratorial, porém a partir do estudo de precursores obtidos por microrganismos (SPINOSA, 2006).

O florfenicol é um antibiótico derivado do cloranfenicol, diferindo-se deste último pela presença de um grupo metil sulfônico e pela presença de um átomo de flúor localizado no agrupamento da função alcoólica primária. É um antibiótico bacteriostático de amplo espectro indicado para bactérias gram-

negativas, agindo na inibição da atividade da enzima peptidiltransferase do ribossomo 70 S (EMA, 1996). É indicado para: 1) tratamento de doenças respiratórias causadas por *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus sommus*; 2) diarreias causadas por *Escherichia coli*; 3) pododermatites causada por *Bacteroides nosodus* e *Bacteroides melaninogenicus*; 4) ceratoconjuntivite infecciosa bovina causada por *Moraxella bovis*, sendo a dose recomendada de 20 mg/Kg pela via intramuscular a cada 48 horas (RADOSTISTS et al., 2002).

Estudos realizados com o florfenicol para determinar a sua cinética demonstraram que o perfil observado foi similar em ratos e bovinos, sendo identificados, nos tecidos analisados, cinco metabólitos: florfenicol, florfenicol amina, florfenicol álcool, ácido oxâmico do florfenicol e monocloroflorfenicol. A principal via de eliminação foi a urina (63-71%), sendo que após a aplicação intramuscular a taxa de absorção foi de 75% (EMA, 1996). Em bovinos após a aplicação de duas injeções intramusculares de 20 mg de [<sup>14</sup>C]-florfenicol por quilo de peso vivo, com 48 horas de intervalo, foram identificados metabólitos urinários, fecais e tissulares. O fármaco foi o principal componente urinário, representando aproximadamente 64% da amostra conjunta de 0 a 120 horas; os demais metabólitos urinários identificados foram: florfenicol amina (~8%), florfenicol álcool (~12%), ácido oxâmico do florfenicol (~12%) e monocloroflorfenicol (<2%) (ESPINASSE, 1994).

A eficácia de um tratamento antimicrobiano é o resultado da dinâmica que envolve a interação de três fatores principais: o hospedeiro, a droga e o organismo infeccioso. As relações entre PK/PD (farmacocinética e farmacodinâmica) são vitais para o conhecimento das atividades microbiológicas em situações clínicas e para definição do poder dos antibióticos necessários para o sucesso esperado na terapia (SCAGLIONE, 2002). O PK é o que o hospedeiro faz com a droga, isto é, a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, como podem ser refletidos pelo curso das concentrações da droga no plasma ou nos tecidos (GREKO, 2003). O PD é o

efeito da droga em função de sua concentração e por último o microrganismo, onde o efeito é demonstrado pela morte ou inibição de seu crescimento. A maioria dos regimes de doses, utilizados para ação contra microrganismos, são desenhados com o objetivo de manter o nível plasmático da droga acima da concentração mínima necessária para inibir o crescimento do patógeno alvo (CPMP, 2000; LEES e ALIABADI, 2002).

Muitos estudos sobre as relações de PK/PD dos antimicrobianos são delineados para explicar como o perfil concentração-tempo da droga atua sobre os microrganismos, sendo utilizados como parâmetros para definirem a eficácia ou ineficácia do fármaco. Segundo Graig (1998), os resultados destes estudos indicam que os antibióticos podem ser divididos dentro de dois grandes grupos: 1) aqueles que agem sobre os microrganismos, sendo dependentes da concentração e que apresentam efeitos persistentes e prolongados e 2) aqueles que exibem a característica de agir sobre os microrganismos, sendo dependentes do tempo e que exibem efeitos com persistência mínima ou moderada. Os fármacos dependentes da concentração, como os: aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, metronidazole e cetolídeos, possuem como principais parâmetros de correlação, entre o PK/PD, a área sobre a curva (AUC) e a concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ) em relação a concentração inibitória mínima (CIM). Já as drogas que exibem sua ação dependente do tempo, o parâmetro que mede o tempo em que a concentração plasmática da droga fica acima do CIM ( $T > CIM$ ) é o principal parâmetro que determina a eficácia; este é o parâmetro utilizado para a avaliação da eficácia do florfenicol.

Em levantamento bibliográfico realizado entre os anos de 2011 e 2012 nas bases de dados do PubMed, Medline, Lilacs e Scielo foram identificados 13 estudos que avaliaram o perfil farmacocinético e/ou eficácia do florfenicol em diversas espécies animais, a saber: cães, ovinos, alpacas, coelhos, galinhas, suínos e bovinos. Dentre esses estudos três foram utilizados como referências

para a realização deste trabalho (VARMA et al, 1991 e PRIEBE & SCHWARTZ, 2003).

Este estudo foi delineado com o objetivo de determinar o perfil farmacocinético e a concentração plasmática eficaz para cada agente etiológico susceptível ao florfenicol, após a administração intramuscular do fármaco na posologia de 20 mg/Kg com intervalo de 48 horas, comparando os resultados obtidos com os estudos *in vitro* para a determinação do CIM e CBM.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### Etapa Clínica

No estudo foram utilizadas 7 bovinos clinicamente saudáveis, fêmeas, de raça mista, com idade média de 7,01 ( $\pm$  4,45) anos e peso médio de 385,00 ( $\pm$  170,02) Kg, provenientes do campus da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista, situada no município de Araçatuba e identificados através de chip RFID (radio frequência) inserido no ligamento da nuca. Durante todo o estudo os animais receberam uma dieta balanceada (ração de manutenção, capim picado e pasto) livre de qualquer medicamento veterinário e água *ad libitum*.

Sete dias antes do tratamento (D-7), os parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos dos animais foram avaliados. As análises dos parâmetros clínicos incluíram: condição corporal, comportamento, temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória, avaliação das mucosas oculares, taxa de hidratação, reflexo pupilar, movimentos ruminais, apetite, fezes e linfonodos. A avaliação dos parâmetros hematológicos consistiu na análise das series vermelha e branca e a análise bioquímica consistiu na avaliação das enzimas hepáticas (AST, GGT, ALP), ureia, creatinina e proteína total.

No D-1 os animais foram pesados e foi calculado o volume do florfenicol a ser administrado, de acordo com a posologia indicada em bula (20 mg/kg ou 1mL/15 kg). No D0 (primeira aplicação) e D+2 (segunda aplicação) os animais receberam a administração do produto **FLORKEM**<sup>®</sup> (Ceva Saúde Animal - lote P003/11, fabricação: março/2011 e validade: março/2013), conforme volume previamente estabelecido no D-1. A aplicação foi feita pela via intramuscular profunda, na região do quarto traseiro, respeitando o volume máximo de 10 mL por ponto de aplicação. Após os tratamentos, os animais tiveram o sangue coletado, por punção venosa da veia jugular, com o auxílio de tubo a vácuo com anticoagulante (BD VACUTAINER<sup>®</sup>) acoplado a um adaptador; foram coletados aproximadamente 15 mL/tempo/animal e que foram mantidos sob refrigeração (máximo de 24 horas após a coleta) até a sua centrifugação para a obtenção do plasma. Os tempos de coleta foram: 1<sup>o</sup> Tratamento - 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 e 48 horas; 2<sup>o</sup> Tratamento - 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas.

Para a obtenção do plasma, o sangue foi centrifugado por um período de 5 minutos a uma velocidade de 2.500 r.p.m em centrifugas da marca FANEN<sup>®</sup>. Após a separação do plasma, o mesmo foi retirado dos tubos com o auxílio de uma micropipeta de 1 mL, armazenado em tubos tipo FALCON<sup>®</sup> (cada tubo recebeu 6 mL de plasma de cada animal) e colocados em um freezer -20°C até o dia do seu transporte para o laboratório responsável pela etapa analítica. Para a realização do transporte, as amostras foram acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo seco e foram entregues diretamente pelo condutor do estudo no Laboratório de Cromatografia (CROMA) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), situada na cidade de São Carlos.

Procedeu-se também a coleta de sangue, por meio de uma bolsa de transfusão, de um animal que não recebeu o tratamento (amostra branca). A bolsa de sangue foi mantida na geladeira na posição vertical até a separação total do plasma. Esse plasma foi utilizado na validação da metodologia

analítica, descrita a seguir, para a determinação da concentração plasmática do florfenicol.

### Etapa Analítica

A etapa analítica foi realizada no Laboratório de Cromatografia (CROMA) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), situada na cidade de São Carlos – SP. A metodologia analítica foi desenvolvida em cromatografia líquida acoplada a espectrofotometria de massas (UPLC/MS/MS – modelo Xevo TQ MS da Waters), de acordo com o Procedimento Operacional Padrão interno: POP-MET-074-Rev01, e validado de acordo com os parâmetros analíticos descritos na resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): Validação de métodos bioanalíticos. Os parâmetros analíticos avaliados foram: linearidade, especificidade/seletividade, exatidão, precisão, recuperação, robustez, limite inferior de quantificação (LIQ), limite de detecção (LD) e estabilidade (figura 1 – exemplo de cromatograma obtido durante o processo de validação).

### Etapa Microbiológica

A metodologia utilizada, para a determinação do CIM e do CBM de cada bactéria, foi delineada de acordo com a norma pertencente ao CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute): M7-A6: “Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição”. Este documento focaliza métodos de referências para a determinação do CIM de bactérias aeróbicas por macrodiluição em caldo, microdiluição em caldo e diluição em ágar. Esta é uma norma de aplicação global desenvolvida mediante o processo consensual do CLSI e adotada no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Dentre as metodologias acima citadas, optou-se por conduzir o estudo em microplacas de 96 poços com volume reduzido de meio para as seguintes bactérias: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida capsular tipo A* e *Histophilus sommus*. As cepas bacterianas utilizadas foram provenientes do acervo de bactérias do laboratório TECSA, situado na cidade de Belo Horizonte – MG, e que também foi o responsável pela condução do estudo (tabela 1).

#### Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos

Para a determinação da biodisponibilidade plasmática do florfenicol em bovinos, os seguintes parâmetros farmacocinéticos foram calculados: área sobre a curva (AUC), concentração máxima ( $C_{max}$ ), tempo máximo ( $T_{max}$ ), constante de eliminação (cte) e meia vida ( $T_{1/2}$ ). Esses parâmetros foram obtidos por meio da utilização de um pacote complementar específico (pacote pkf) do MICROSOFT EXCEL 2007.

#### Cálculo da eficácia do florfenicol

O cálculo da eficácia do florfenicol foi realizado analisando o tempo de exposição da bactéria ao fármaco, ou seja, com os dados obtidos do CIM, na etapa microbiológica, e com os dados calculados dos parâmetros farmacocinéticos, foi possível construir um gráfico com a curva plasmática do florfenicol acrescentando os dados do CIM. Desta forma a eficácia do florfenicol seria comprovada, se a concentração plasmática do florfenicol, em um período de 48 horas, ficasse acima do CIM determinado para cada bactéria.

## **RESULTADOS**

#### Etapa Analítica

Após a validação da metodologia analítica, os resultados demonstraram que o método foi seletivo (tempo de retenção do florfenicol  $\geq 80\%$ ), linear

(coeficiente de correlação ( $r \geq 0,98$ ), preciso (coeficiente de variação (CV)  $\leq 20\%$ ), exato (desvio  $\leq 20\%$  em relação ao LIQ e  $\leq 15\%$  para demais concentrações da curva), robusto (não houve variações significativas na análise do florfenicol com a variação no tempo de extração) e recuperável (intervalo de recuperação entre 70 e 120%). O teste de estabilidade (ciclo de congelamento/descongelamento e pós-processamento) demonstrou que os níveis estudados de florfenicol (15 e 200 ng/g) foram mantidos. O LIQ estabelecido foi de 5 ng/g e o LD de 2,5 ng/g. Assim sendo, o método desenvolvido, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UPLC/MS/MS), foi válido para determinação do florfenicol em plasma bovino.

#### Etapa Microbiológica

Os CIM's obtidos em laboratório, para as bactérias de interesse, foram: *Mannheimia haemolytica* = 0,75  $\mu\text{g/mL}$ , *Pasteurella multocida capsular tipo A* = 0,75  $\mu\text{g/mL}$  e *Histophilus sommus* = 0,30  $\mu\text{g/mL}$ ; os resultados do CBM foram: *Mannheimia haemolytica* = 0,75  $\mu\text{g/mL}$ , *Pasteurella multocida capsular tipo A* = 1,5  $\mu\text{g/mL}$  e *Histophilus sommus* = 0,30  $\mu\text{g/mL}$  (tabela 2 e 3).

#### Parâmetros farmacocinéticos

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos para o florfenicol após a primeira aplicação foram:  $C_{\text{max}} = 1,21 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ ;  $T_{\text{max}} = 3,43 \pm 2,23 \text{ h}$ ;  $\text{AUC}_{0-t} = 34,16 \pm 4,50 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ ;  $\text{AUC}_{0-\text{INF}} = 84,91 \pm 26,17 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ ;  $\text{cte} = 0,013 \pm 0,007$ ;  $T_{1/2} = 63,46 \pm 23,76 \text{ h}$  (tabela 4 e figura 2) e para a segunda aplicação foram:  $C_{\text{max}} = 1,17 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$ ;  $T_{\text{max}} = 6,00 \pm 0,00 \text{ h}$ ;  $\text{AUC}_{0-t} = 52,37 \pm 5,50 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ ;  $\text{AUC}_{0-\text{inf}} = 91,93 \pm 41,03 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ ;  $\text{cte} = 0,01 \pm 0,005$ ;  $T_{1/2} = 77,74 \pm 43,65 \text{ h}$  (tabela 5 e figura 2).

## DISCUSSÃO

A avaliação da eficácia do florfenicol frente às bactérias causadoras de doenças respiratória dos bovinos foi calculada através da correlação dos dados obtidos previamente pela realização do CIM, para cada agente etiológico, e do cálculo dos parâmetros farmacocinéticos, do antibiótico acima citado, no plasma bovino. Os dados obtidos na literatura foram usados como base para a elaboração do delineamento experimental e para a avaliação da eficácia do florfenicol.

Em pesquisa realizada por Priebe & Schwarz (2003), entre os anos de 2000 e 2001, que teve por objetivo monitorar, *in vitro*, a suscetibilidade das bactérias causadoras de doenças respiratória dos bovinos ao florfenicol. Neste estudo foram isoladas 122 amostras de *P. multocida* e 118 amostras de *M. haemolytica* oriundas de swab nasal ou coletada de tecido pulmonar de animais doentes (necropsia). Os resultados dos CIMs obtidos para essas bactérias foram de 0,25 µg/mL para *P. multocida* e de 1 µg/mL *M. haemolytica* e 100% das cepas isoladas foram susceptíveis ao florfenicol. Ao comparar os dados previamente apresentados, com os dados do presente estudo (tabela 2) é possível determinar que os valores do CIM diferem-se, para ambas as bactérias estudadas (CIM = 0,75 µg/mL), porém a suscetibilidade das mesmas ao florfenicol continua sendo 100% (figura 3 e 4). Enquanto que para a *P. multocida* o CIM atualmente apresentado foi maior, para a *M. haemolytica* o CIM foi menor demonstrando uma diferença entre os valores obtidos na literatura e os valores atuais. Essa variação pode ser justificada devido a localização do estudo e/ou a diferença genética da cepa ou ainda ao surgimento de cepas mais resistente ao florfenicol.

O delineamento experimental do estudo teve como objetivo usar a mesma via de administração, posologia e dose que o trabalho publicado previamente por Varma et al. (1991) para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos do florfenicol. No estudo conduzido por Varma et al. (1991)

foram administradas duas aplicações do florfenicol por via intramuscular, com intervalo de 48 horas, na dose de 20 mg/kg de peso vivo. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados de forma independente para cada aplicação. Após a primeira aplicação os parâmetros farmacocinéticos obtidos foram:  $C_{max} = 3,78 \pm 0,59 \mu\text{g/mL}$ ;  $T_{max} = 3,17 \pm 1,33 \text{ h}$ ;  $AUC_{0-t} = 73,9 \pm 5,50 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ ;  $T_{1/2} = 9,37 \pm 2,55 \text{ h}$ ; enquanto que para a segunda aplicação os valores foram:  $C_{max} = 4,11 \pm 0,72 \mu\text{g/mL}$ ;  $T_{max} = 3,17 \pm 1,47 \text{ h}$ ;  $AUC_{0-t} = 88,7 \pm 10,90 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ ;  $T_{1/2} = 11,4 \pm 2,22 \text{ h}$ . O presente estudo encontrou valores diferentes, conforme apresentados nas tabelas 4 e 5, para os mesmos parâmetros farmacocinéticos:  $C_{max} = 1,21 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ ;  $T_{max} = 3,43 \pm 2,23 \text{ h}$ ;  $AUC_{0-t} = 34,16 \pm 4,50 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ ;  $T_{1/2} = 63,46 \pm 23,76 \text{ h}$  e  $C_{max} = 1,17 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$ ;  $T_{max} = 6,00 \pm 0,00 \text{ h}$ ;  $AUC_{0-t} = 52,37 \pm 5,50 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ ;  $T_{1/2} = 77,74 \pm 43,65 \text{ h}$ , respectivamente para a primeira e segunda aplicação.

Ao analisar e comparar os valores obtidos neste estudo, com os valores obtidos por Varma et al (1991) é possível sugerir que a taxa de absorção do produto utilizado é menor; isso porque os valores obtidos para o  $C_{max}$  e  $AUC_{0-t}$  são inferiores. Por outro lado, é possível também sugerir que a tempo de eliminação do produto é menor uma vez que a meia vida plasmática ( $T_{1/2}$ ) é superior aos dados apresentado na literatura. Essa diferença encontrada, entre os valores obtidos, entre os estudos é justificável devido aos seguintes fatores: 1) no presente estudo foram utilizados bovinos adultos, fêmeas e raça mista, enquanto que o estudo conduzido por Varma et. al. (1991) utilizou bezerros, de ambos os sexos e de raça definida, 2) os produtos utilizados possuem formulações (excipientes) diferentes; esses dois fatores interferem na farmacocinética do produto, ou seja, interfere em sua absorção, metabolização e eliminação.

A eficácia do florfenicol foi calculada correlacionando o tempo que a concentração plasmática da droga ficou acima CIM estabelecido para cada bactéria avaliada ( $T > \text{CIM}$ ). Para as bactérias *P. multocida* e *M. haemolytica* o tempo de permanência das concentrações plasmática acima do CIM ficou em

torno de 24 horas (figura 3 e 4) após a primeira e segunda aplicação; enquanto que para a bactéria *H. somnus* a concentração plasmática permaneceu, durante todo o estudo, acima do CIM estabelecido (figura 5). Com base nestes resultados, conclui-se que o florfenicol é eficaz contra *P. multocida*, *M. Haemolytica* e *H. somnus*, portanto, o produto é indicado para o tratamento de doenças respiratórias dos bovinos, causada pelas bactérias apresentadas neste estudo, porém é recomenda-se que o intervalo entre doses seja reduzido, para 24 horas, para as bactérias *P. multocida* e *M. haemolytica*; já para a bactéria *H. somnus* o intervalo de 48 horas pode ser mantido.

### **LISTA DE ABREVIações**

PK: pharmacokinetics (farmacocinética); PD: pharmacodynamics (farmacodinâmica); AUC: área under curve (área sobre a curva);  $C_{max}$ : Concentração plasmática máxima;  $T_{max}$ : tempo máximo; LD: limite de detecção; LIQ: limite inferior de quantificação; CIM: concentração inibitória mínima; CBM: concentração bactericida mínima.

### **CONFLITO DE INTERESSES**

As fontes de apoio financeiro foram reconhecidas e os autores declaram que não têm interesses competitivos.

### **CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES**

LGRP e LCNM participaram da concepção e desenho do modelo experimental realizado nos animais, coleta e análise dos dados obtidos e confecção do artigo científico; JFA e OLFJ realizaram os exames clínicos, pesagem e coleta de sangue dos animais Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

### **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi financiado pela CEVA SAÚDE ANIMAL que custou todo o projeto de pesquisa. Agradecer também a todos os participantes do projeto pela ajuda e contribuição na condução e elaboração do estudo.

## REFERENCIAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos** - Resolução RE nº 899, de 29 de maio 2003.

ESPINASSE, J. – **Simpósio internacional sobre doença respiratória bovina** – XVIII Congresso Mundial de Buiatria, 1994.

EMA – European Medicines Agency – **Florfenicol: summary report (1) – committee for veterinary products** – 1996.

GRAIG, W.A. - Choosing an antibiotic on the basis of pharmacodynamic. Ear, Nose, Throat Journal 77 (suppl.6):7-11, 1998.

GREKO, C. - **Tissue cages in calves for studies on Pharmacokinetic/Pharmacodynamic relationships of antimicrobials.** Doctoral thesis: Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. 61p, 2003.

LEES, P and ALIABADI, F. S. - **Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans.** International journal of antimicrobial agents 19:269-284, 2002.

PRIEBE, S.; SCHAWARZ, S. – **In vitro activities of florfenicol against bovine and porcine respiratory tract pathogens.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47: 2703-2705, 2003.

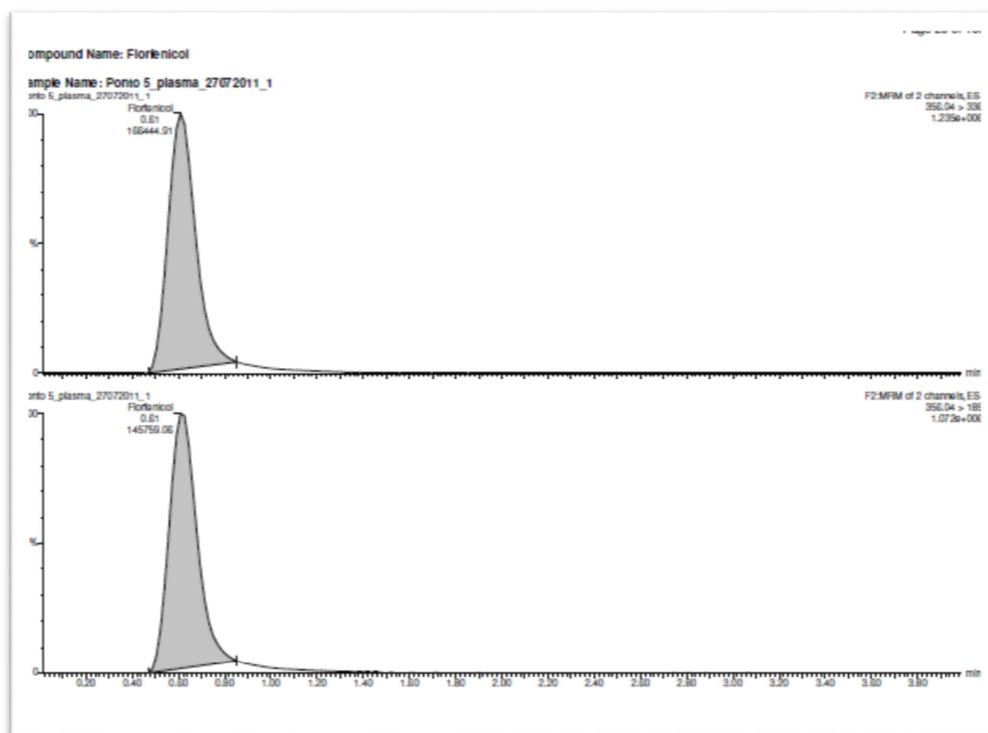
RADOSTITS, O. M. et al – **Clínica veterinária um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos.** 9º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SCAGLIONE, F. - **Can PK/PD be used in everyday clinical practice.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 19:349-353, 2002.

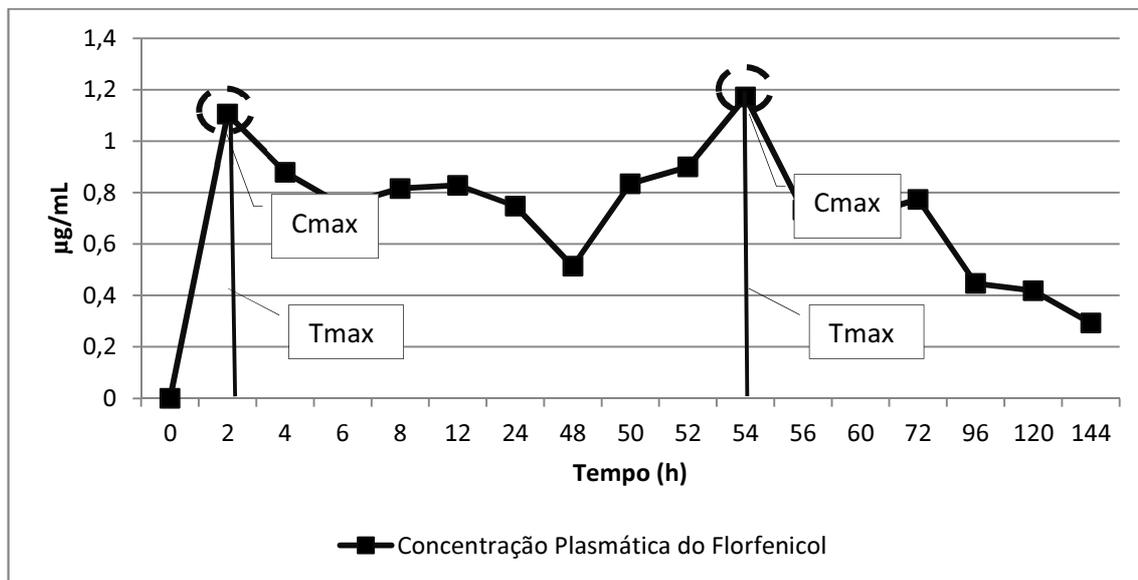
SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, Maria M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

VARMA et al. **Pharmacokinetics and efficacy of a new broad spectrum antibiotic, florfenicol in cattle.** *Acta Veterinaria Scandinavica*,102-104, 1991.

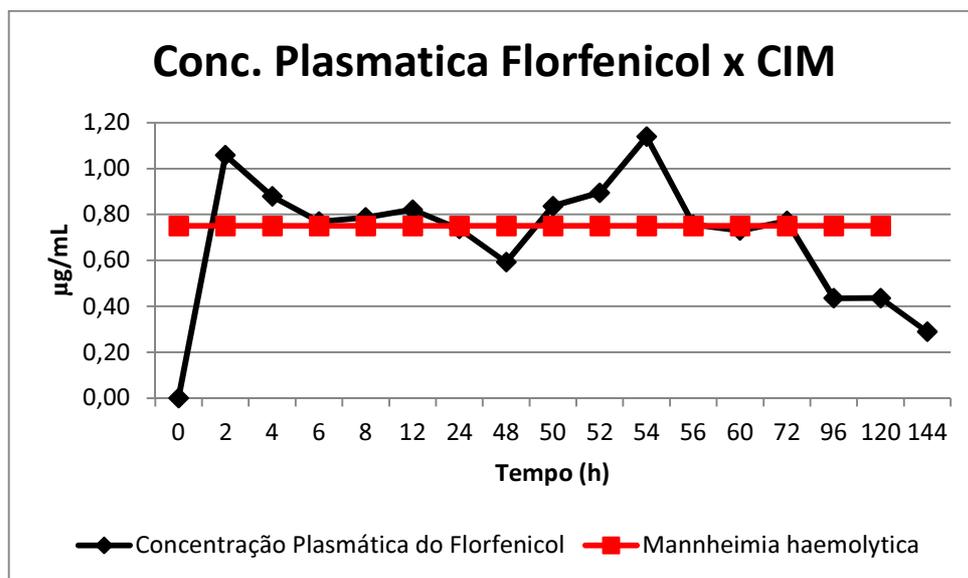
## ILUSTRAÇÕES E FIGURAS



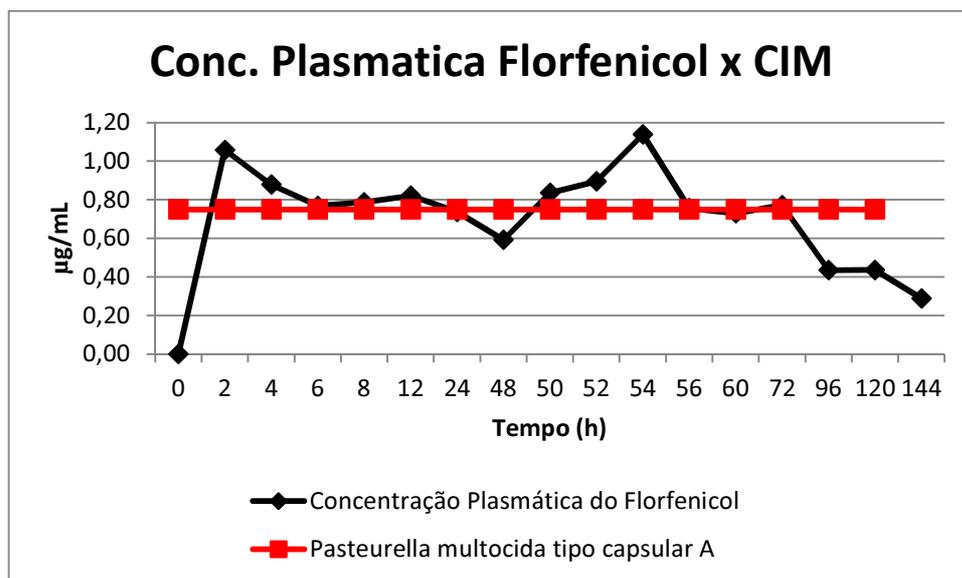
**Figura 1** - Representação gráfica de um cromatograma obtido no processo de validação analítica.



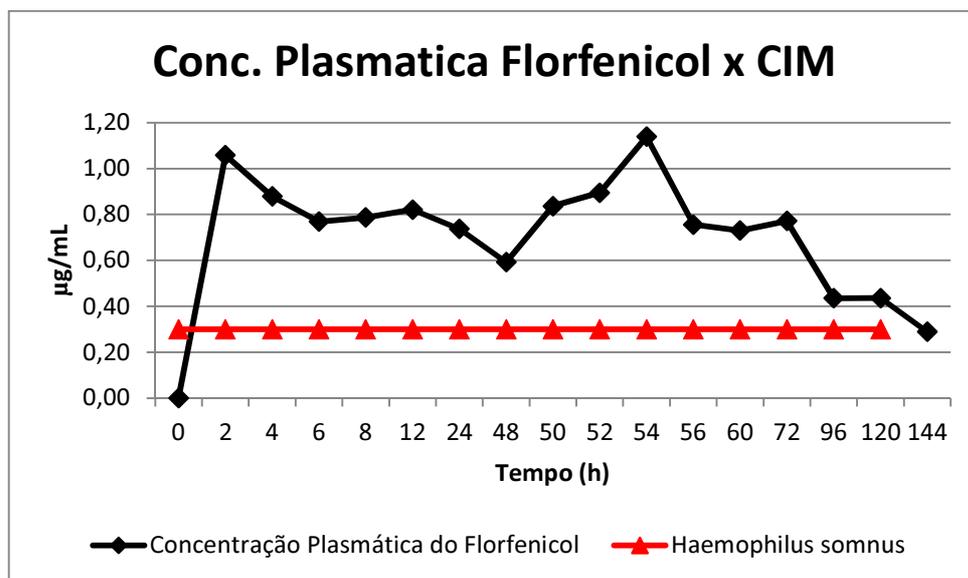
**Figura 2** - Representação gráfica da biodisponibilidade plasmática do florfenicol em bovinos tratados pela via intramuscular profunda, após a primeira e segunda aplicação. Após a primeira aplicação:  $C_{max} = 1,21 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ ,  $T_{max} = 3,43 \pm 2,23 \text{ h}$ ,  $AUC_{0-t} = 34,16 \pm 4,50 \text{ h. } \mu\text{g /mL}$ ,  $T_{1/2} = 63,46 \pm 23,76 \text{ h}$ . Após a segunda aplicação:  $C_{max} = 1,17 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$ ;  $T_{max} = 54,00 \pm 0,0 \text{ h}$ ;  $AUC_{0-t} = 52,37 \pm 5,50 \text{ h. } \mu\text{g /mL}$ ;  $T_{1/2} = 77,74 \pm 43,65 \text{ h}$ .



**Figura 3** - Representação gráfica da biodisponibilidade plasmática x CIM do florfenicol. **T>CIM** indicando que o antibiótico é eficaz contra *Mannheimia haemolytica* - cepa de campo, quando utilizado este método de análise.



**Figura 4** - Representação gráfica da biodisponibilidade plasmática x CIM do florfenicol. **T>CIM** indicando que o antibiótico é eficaz contra *Pasteurella multocida* tipo capsular A - cepa de campo, quando utilizado este método de análise.



**Figura 5** - Representação gráfica da biodisponibilidade plasmática x CIM do florfenicol. **T > CIM** indicando que o antibiótico é eficaz contra *Haemophilus somnus* - cepa de campo, quando utilizado este método de análise.

## TABELAS E LEGENDAS

**Tabela 1-** Microrganismos utilizados no teste de CIM e CBM

Microorganismo	AMT	Características
<i>Mammhenia haemolytica</i>	7682	São bastonetes pequenos anaeróbio, não esporulados e imóveis. Apresentam coloração bipolar, evidenciada pelo método de Wright. Utilizam açúcares por fermentação e crescem em meio MacConkey, lactose negativa e indol positivo.
<i>Pasteurella multocida</i> tipo capsular A	7802	São bastonetes pequenos ou cocobacilos aeróbios e facultativamente anaeróbios, não esporulados e imóveis. Apresentam coloração bipolar, evidenciada pelo método de Wright. Utilizam açúcares por fermentação. Não cresce em meio MacConkey, lactose negativa, hemólise negativa e indol positivo.
<i>Histophilus somnus</i>	7737	São bastonetes pequenos ou cocobacilos gram negativos, imóveis, não esporulados, aeróbios ou microaerófilos, pleomórficos, formando filamentos quando vistos ao microscópio comum. Requerem fator X e/ou vermelho para crescimento.

Legenda: ATM – Acervo de Microrganismo TECSA

**Tabela 2** - Concentração Inibitória Mínima (CIM) para as bactérias estudadas

<b>Microorganismo</b>	<b>AMT</b>	<b>CIM</b>
<i>Mammhenia haemolytica</i>	7682	0,75 µg/mL
<i>Pasteurella multocida</i> tipo capsular A	7802	0,75 µg/mL
<i>Histophilus somnus</i>	7737	0,30 µg /mL

**Tabela 3** - Concentração Bacterida Máxima (CBM) para as bactérias estudadas

<b>Microorganismo</b>	<b>AMT</b>	<b>CIM</b>
<i>Mammhenia haemolytica</i>	7682	0,75 µg/mL
<i>Pasteurella multocida</i> tipo capsular A	7802	1,50 µg/mL
<i>Histophilus somnus</i>	7737	0,30 µg/mL

**Tabela 4** - Resumo dos parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir dos ensaios cromatográficos em plasma de bovinos tratados pela via intramuscular profunda, com florfenicol, após a primeira aplicação

Animal	Parâmetros Farmacocinéticos – 1 <sup>o</sup> Aplicação					
	C <sub>max</sub> (µg/mL)	T <sub>max</sub> (h)	AUC <sub>0-t</sub> (h. µg/mL)	AUC <sub>0-INF</sub> (h. µg/mL)	Cte	T <sub>1/2</sub> (h)
161	0,97	4,00	28,79	93,81	0,008	87,69
173	0,88	8,00	32,66	79,06	0,010	70,13
180	1,34	2,00	39,10	93,61	0,011	60,91
214	1,62	2,00	33,63	57,53	0,018	39,51
235	1,19	2,00	30,26	129,65	0,008	89,84
245	1,18	4,00	33,47	89,66	0,010	70,53
323	1,29	2,00	41,24	51,03	0,027	25,64
<b>Media</b>	<b>1,21</b>	<b>3,43</b>	<b>34,16</b>	<b>84,91</b>	<b>0,013</b>	<b>63,46</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,25</b>	<b>2,23</b>	<b>4,50</b>	<b>26,17</b>	<b>0,007</b>	<b>23,76</b>

**Tabela 5** - Resumo dos parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir dos ensaios cromatográficos em plasma de bovinos tratados pela via intramuscular profunda, com florfenicol, após a segunda aplicação

Animal	Parâmetros Farmacocinéticos – 2 <sup>o</sup> Aplicação					
	C <sub>max</sub> (µg/mL)	T <sub>max</sub> (h)	AUC <sub>0-t</sub> (h. µg/mL)	AUC <sub>0-INF</sub> (h. µg/mL)	Cte	T <sub>1/2</sub> (h)
161	0,82	6,00	49,00	167,96	0,005	146,46
173	1,00	6,00	63,49	126,26	0,005	130,73
180	1,15	6,00	49,14	65,43	0,013	52,75
214	1,25	6,00	46,65	53,55	0,019	36,94
235	1,20	6,00	52,69	66,33	0,015	46,17
245	1,48	6,00	53,99	74,51	0,013	52,93
323	1,30	6,00	51,66	89,45	0,009	78,20
<b>Media</b>	<b>1,17</b>	<b>6,00</b>	<b>52,37</b>	<b>91,93</b>	<b>0,01</b>	<b>77,74</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,20</b>	<b>0,00</b>	<b>5,50</b>	<b>41,03</b>	<b>0,005</b>	<b>43,65</b>