

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANDRÉ EDUARDO SCHLEMPER

Avaliação terapêutica de um nanocompósito híbrido à base de lipossomas e
pectina para liberação sustentada de norfloxacin em camundongos (*Mus
musculus*) infectados

Uberlândia

2023

ANDRÉ EDUARDO SCHLEMPER

Avaliação terapêutica de um nanocompósito híbrido à base de lipossomas e pectina para liberação sustentada de norfloxacin em camundongos (*Mus musculus*) infectados da linhagem C57/6

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde animal

Orientadora: Prof^a Dr^a Belchiorina Beatriz Fonseca

Coorientadora: Prof^a Dra. Lígia Nunes de Moraes Ribeiro

Uberlândia

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S341 Schlemper, André Eduardo, 1994-
2023 Avaliação terapêutica de um nanocompósito híbrido à
base de lipossomas e pectina para liberação sustentada
de norfloxacin em camundongos (*Mus musculus*) infectados
[recurso eletrônico] / André Eduardo Schlemper. - 2023.

Orientadora: Belchiorina Beatriz Fonseca.
Coorientadora: Lígia Nunes de Moraes Ribeiro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.88>
Inclui bibliografia.

1. Veterinária. I. Fonseca, Belchiorina Beatriz, 1978-,
(Orient.). II. Ribeiro, Lígia Nunes de Moraes, 1986-,
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias
BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO PPGCVET Nº 06/2023				
Data:	06 de fevereiro de 2023	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	[hh:mm]
Matrícula do Discente:	12112MEV002				
Nome do Discente:	ANDRÉ EDUARDO SCHLEMPER				
Título do Trabalho:	Avaliação terapêutica de um nanocompósito híbrido à base de lipossomas e pectina para liberação sustentada de norfloxacin em camundongos (<i>Mus musculus</i>) infectados				
Área de concentração:	SAÚDE ANIMAL				
Linha de pesquisa:	INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Estudos de epidemiologia, de novas técnicas de diagnóstico e prevenção de doenças bacterianas em animais domésticos e selvagens				

Reuniu-se por videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Senhores: Leandro Zucolotto Crivellenti - FAMEV/UFU; Amanda Leite Bastos Pereira - UDESC; e Belchiolina Beatriz Fonseca - FAMEV/UFU, orientadora do candidato.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Belcholina Beatriz Fonseca, Professor(a) do Magistério Superior**, em 06/02/2023, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Zuccolotto Crivellenti, Membro de Comissão**, em 06/02/2023, às 16:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Leite Bastos Pereira, Usuário Externo**, em 08/02/2023, às 10:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4229539** e o código CRC **D0AA13B2**.

ANDRÉ EDUARDO SCHLEMPER

Avaliação terapêutica de um nanocompósito híbrido à base de lipossomas e pectina para liberação sustentada de norfloxacin em camundongos (*Mus musculus*) infectados da linhagem C57/6

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde animal

Orientadora: Prof^a Dr^a Belchiolina Beatriz Fonseca

Coorientadora: Prof^a Dra. Lígia Nunes de Moraes Ribeiro

Uberlândia, 6 de fevereiro de 2023

Banca Examinadora:

Belchiolina Beatriz Fonseca – Doutora (FAMEV-UFU)

Leandro Zucolotto Crivellenti – Doutor (FAMEV-UFU)

Amanda Leite Bastos Pereira – Doutora (CAV-UDESC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família que possibilitou que minha trajetória de vida me trouxesse até aqui;

Aos colegas de colégio, graduação e a quem conheci nessa jornada da pós-graduação.

A UDESC por ter me dado base técnica e ajudado a formar a pessoa e o profissional que sou hoje.

Aos professores Thiago El Hadi Perez Fabregat e Aury Nunes de Moraes por terem sido meus primeiros orientadores e me motivado dentro da vida acadêmica.

A professora Lígia Nunes de Moraes Ribeiro, a técnica Simone Sommerfeld e a professora Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi por terem me auxiliado e me dado suporte durante a execução desse projeto.

E principalmente a Professora Bia por além de ter me acolhido como orientado numa fase muito difícil, nunca deixou de prestar suporte pra absolutamente tudo que fosse necessário durante essa jornada.

RESUMO

A evolução dos casos de resistência bacteriana às formulações antibióticas atuais, o crescente número de casos de superbactérias, a demanda por métodos para melhorar a eficácia dos medicamentos já conhecidos instigaram esse estudo. Uma das formas utilizadas para potencializar ação meia-vida e diminuir os efeitos adversos dos antibióticos é a utilização de lipossomas como carreadores de moléculas de fármacos. Este trabalho avaliou a eficácia de diferentes doses e administrações de uma formulação nanohíbrida de lipossomas, pectina e norfloxacina (PEC@LUVNOR) em camundongos C57/6 infectados experimentalmente com *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PA PAO1) como modelo preliminar para futuros testes em *pets*. Em um primeiro momento foi realizada a revisão da literatura para melhor apresentar o contexto do estudo. Em um segundo capítulo foi apresentado os resultados por um artigo científico. Um total de 86 roedores foram infectados com PA PAO1 e após tratados com diferentes doses terapêuticas e subterapêuticas (20 e 5mg/Kg) e dois (2) esquemas de intervalos de administração, sendo um após 24 horas de inoculação (pi) (dose única) e outro 24 e 72 horas pi de PEC@LUV/NOR. A formulação comercial de norfloxacina foi usada como controle positivo. Os resultados mostraram alta eficiência em doses menores da formulação nanohíbrida em relação às formulações comerciais, maior facilidade de administração do medicamento devido à necessidade de menor número de repetições para que haja o efeito desejado da droga. Assim, a formulação nanohíbrida PEC@LUV/NOR é uma alternativa com grande potencial para substituir formulações tradicionais.

Palavras-chave: nanotecnologia, resistência aos antimicrobianos, menor efeito adverso, mucoadesivo, maior disponibilidade.

ABSTRACT

The evolution of cases of bacterial resistance to current antibiotic formulations, the growing number of cases of superbugs, and the demand for methods to improve the effectiveness of known drugs instigated this study. One way to enhance the effect, half-life and decrease the side effects of antibiotics is by using liposomes as carriers of drug molecules. This work evaluated the effectiveness of different doses and administrations of a nanohybrid formulation of liposomes, pectin and norfloxacin (PEC@LUVNOR) in C57/6 mice experimentally infected with *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PA PAO1) as a preliminary model for future tests in pets. At first, a literature review was carried out to present the context of the study better. In the second chapter, the results of a scientific article were presented. A total of 86 rodents were infected by PA PAO 1 and treated with two therapeutic and subtherapeutic doses (20 and 5mg/Kg) and two dosing interval schedules, being 24 hours post-infection (pi) in a single dose or 24 and 72 hours pi of PEC@LUV/NOR. The commercial formulation of norfloxacin was used in parallel. The results showed high efficiency in smaller doses of the nanohybrid formulation compared to commercial formulations, and greater ease of drug administration due to the need for fewer repetitions for the desired drug effect. Thus, the PEC@LUV/NOR nanohybrid formulation is an alternative with great potential to replace traditional formulations.

Keywords: nanotechnology, antibiotics resistance, less side effect, mucoadhesive, greater availability.

Sumário

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 Antibióticos	12
3.2 Sistemas de liberação e carreadores nanoestruturados	14
3.3 Pectina	16
3.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	16
CAPÍTULO 2	19
1.Introduction	20
2. Material and Methods	20
2.1 PEC@LUV/NOR	21
2.2 Comercial Norfloaxin	21
2.3 Infectious agent	21
2.4 Experimental animals	21
2.5 Agent inoculation	22
2.6 Treatments	22
2.7 Biological samples	22
2.8 Histopathological analysis	23
2.9 Statistical analysis	23
3. Results	24

3.1 Behavior assessment	24
3.2 Histopathological results	25
3.2.1 Circulatory changes	25
3.2.2 Degenerative alterations	26
3.2.3 Necrotic alterations	27
4.Discussion	29
REFERÊNCIAS.....	31

INTRODUÇÃO

A utilização de antibióticos encapsulados em vesículas lipossomais apresenta uma grande vantagem na proteção do fármaco contra a degradação, prolongamento da liberação e diminuição nos efeitos adversos decorrentes do seu metabolismo, além de ter potencial de otimizar a eficácia terapêutica da molécula-ativa do sistema (ALHARIRI et al., 2013).

O uso de lipossomas seria uma vantagem para o tratamento de *pets* pela facilidade do tratamento (maior intervalo entre doses), menor dose e consequente menor efeitos adversos e toxicidade, além da possibilidade de ser um aliado no combate de um dos maiores perigos biológicos que tem sido exposto na atualidade, a resistência antimicrobiana, por partes das bactérias, as chamadas super bactérias.

Os fármacos podem também ser associados aos polímeros para melhoria de suas capacidades físico-químicas e farmacológicas, melhorando a especificidade da sua ação em determinadas situações e com isso sendo uma importante aliado no combate ao aumento dos casos de resistências bacterianas (DRULIS-KAWA & DOROTKIEWICKZ-JACH, 2009). Dentre os polímeros utilizadas para a associação com fármacos se destaca a pectina, um heteropolissacarídeo derivado inicialmente da estrutura de plantas terrestres, que vem sendo utilizada como uma excelente matriz para carreamento de fármacos, uma vez que apresenta importante propriedade mucoadesiva aliada a resistência ao pH ácido do estômago, o que aumenta a estabilidade dos fármacos ligados a ela (LI et al., 2021).

A norfloxacin é uma droga antibiótica da classe das fluorquinolonas, amplamente utilizada no tratamento de doenças do trato urinário, osteomielites, otites, prostatites no combate a agentes gram-negativos e gram-positivos (SPINOSA et. al., 2006). O número de agentes que desenvolveram resistência a norfloxacin tem aumentado, já se tendo relatos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (FUKUDA et al., 1990) e *Escherichia coli* (LINDGREN et al., 2005) com genes específicos que as concederem essa característica. Uma das limitações na utilização da norfloxacin é sua baixa absorção intestinal e

consequente baixa biodisponibilidade após administração oral, o que faz com que seja necessário uma maior dose, com isso aumentando seus efeitos adversos gastrointestinais, como emese, desconforto abdominal e azia (SPINOSA et. al., 2006).

A formulação PEC@LUV/NOR, é um sistema nanohíbrido de norfloxacin lipossomal e pectina, que foi desenvolvida e previamente testada *in vitro* e em modelo *in vivo* em que foram observados resultados que mostraram as características supramoleculares da formulação nanohíbrida (RIBEIRO et al., 2020). Dentre outros achados, uma diminuição da concentração inibitória mínima (CIM) (com alguns casos uma diminuição da resistência bacteriana ao antibiótico) e um prolongamento do perfil de liberação do fármaco e menor toxicidade foram observados (RIBEIRO et. al, 2020).

No presente trabalho o objetivo foi testar a formulação PEC@LUVNOR em camundongos C57/6 expostos a infecção experimental por PA PAO 1 para avaliar a eficiência da formulação *in vivo* e obter um esquema de administração terapêutica eficaz na posterior utilização em extrapolação alométrica para testes em animais domésticos.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia da formulação nanohíbrida de norfloxacin lipossomal PEC@LUV/NOR no combate a infecção experimental por PA PAO1 em camundongos da linhagem C57/6 em diferentes doses e esquemas de administração em comparação as doses terapêuticas usuais de norfloxacin.

1.2 Objetivos específicos

Avaliar a efetividade das diferentes doses da formulação PEC@LUV/NOR no combate a uma infecção experimental;

Avaliar diferentes esquemas de administração da formulação PEC@LUV/NOR no combate a uma infecção experimental;

Identificar, quantificar e qualificar possíveis lesões renais a partir de análise histopatológica dos rins dos camundongos utilizados no experimento;

Obter uma dose terapêutica em camundongos para futura utilização por extrapolação alométrica da formulação PEC@LUV/NOR para testes em outras espécies;

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1. Antibióticos

A origem do termo 'antibiótico' pode ser rastreada até a palavra *antibiose*, usada pela primeira vez como antônimo de simbiose por Paul Vuillemin em sua publicação de 1890 para descrever a ação antagônica entre diferentes microrganismos (por exemplo, fungos x bactérias; bactérias x protozoários) (NICOLAOU & RIGOL, 2017). Mais tarde, a palavra antibiótico foi usada para descrever metabólitos secundários de ocorrência natural produzidos por bactérias e fungos que possuíam atividades inibitórias de crescimento (bacteriostáticas) ou matadoras (bactericidas) contra bactérias ou fungos. Hoje o termo tem um significado mais amplo, descrevendo moléculas projetadas para o controle de microorganismos, porém sendo preconizado o uso dos termos antibacteriano ou antifúngico, para designar suas ações específicas contra bactérias e fungos (BENTLEY & BENNETT, 2003).

Os antibióticos tiveram um efeito não apenas no tratamento de doenças infecciosas, mas também na sociedade, alterando a morbidade e a mortalidade. Desde a introdução de os primeiros antimicrobianos (1911), várias novas drogas foram descobertas, fornecendo aos médicos mais opções terapêuticas para doenças que antes ameaçavam a vida. No entanto, o amplo uso de drogas antimicrobianas introduziu uma nova era na qual os médicos devem enfrentar a surgimento de patógenos resistentes as drogas conhecidas (ZAFFIRI et al., 2012). Durante o século XIX, infecções como pneumonia, diarreia e difteria representaram as principais causas da morte. Além disso, a Revolução Industrial e a urbanização que se aproximava levou a um deslocamento da população para as cidades, o que consequentemente aumentou a incidência de doenças como tuberculose e sífilis (WALLACE et al., 2000).

Com a produção de derivados semi-sintéticos na era moderna, o termo “antibióticos” foi substituído pelo termo “antimicrobianos” que se refere a substâncias naturais, semissintéticas e sintéticas capazes de inibir a proliferação de micróbios levando-os à apoptose (KOURKOUTA et al., 2018).

A descoberta de uma classe de fármacos que pode ser comercializada e administrada de forma fácil e rotineira para tratar infecções bacterianas revolucionou a medicina, sendo uma das maiores descobertas médicas de todos os tempos (MUNITA & ARIAS, 2016). Infelizmente essa popularização do acesso ao tratamento antimicrobiano levou a uma utilização indiscriminada por parte da população civil e da saúde, o que resultou no aumento do número de casos de resistência bacteriana em vários dos patógenos mais comuns, e assim, é uma grande preocupação na área científica (FONSECA et. al, 2019). O risco sanitário decorrente do aumento nos surtos causados por bactérias multirresistentes levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar a resistência a antibióticos como uma das três ameaças sanitárias mais importantes para a saúde pública do século XXI (WORLD HEALTH ORGANIZATION et al., 2014).

Dentro as classes de antimicrobianos, uma das que se destaca são as quinolonas que compõem um grupo de substâncias químicas antibacterianas, com grande aplicação tanto em Medicina Humana como em Medicina Veterinária. A primeira quinolona introduzida foi o ácido nalidíxico, seguindo-se a flumequina e o ácido oxonílico. Dentre as quinolonas, as mais utilizadas atualmente são as fluorquinolonas, devido aos seus menores efeitos colaterais e maior espectro de ação. As principais fluorquinolonas são a enrofloxacin (exclusivamente de uso veterinário), orbifloxacin, difloxacin e marbofloxacin (exclusivamente de uso veterinário), norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, lomefloxacin e pefloxacin (Spinosa et al., 2006).

A norfloxacin é muito utilizada como opção terapêutica em casos de cistites crônica ou recorrentes, que tem como mecanismo de ação a inibição das topoisomerasas bacterianas do tipo II, também conhecida como DNA girase; *in vitro* inibem também a topoisomerase IV, porém não se sabe se esse fato contribui para ação antibacteriana. As topoisomerasas são enzimas que catalisam a direção e a extensão do espiralamento das cadeias de DNA. Assim, embora as quinolonas apresentem diferentes características de ligação com a enzima, todos estes quimioterápicos inibem a DNA girase, impedindo o enrolamento da hélice de DNA em uma forma superespiralada. Em mamíferos, existem algumas topoisomerasas, entretanto as quinolonas não exercem ação sobre estas enzimas (GÓRNIK in SPINOSA et al., 2006). Além disso, é uma

molécula anfotérica de baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade em humanos e animais pós administração oral (<40%), devido a sua baixa absorção intestinal e baixa aderência nas mucosas, o que contribuiu para limitar a atividade antimicrobiana e os microrganismos resistentes (DONG et al., 2011). Tais características químico-físicas da molécula tornam muitas vezes sua administração oral pouco eficiente, o que limita sua eficácia, além de contar com mais efeitos adversos se comparada com outras drogas mais modernas. Entre os principais efeitos colaterais se destacam as alterações gástricas e intestinais (NORRBY, 1986).

A norfloxacin é uma fluoroquinolona derivada do ácido nalidíxico, comumente administrada pela via oral (HOLMES et al., 1985). Aproximadamente 30% de uma dose administrada é excretada como fármaco inalterado por filtração glomerular e secreção tubular (STEIN, 1987). Após uma dose única de norfloxacin, os níveis terapêuticos do fármaco na urina são alcançados rapidamente e mantidos por pelo menos 12 a 24 horas. A norfloxacin tem uma meia-vida de eliminação terminal de aproximadamente três horas, embora a presença de uma taxa de filtração glomerular reduzida aumente a meia-vida de eliminação (ADHAMI et al., 1984). O metabolismo hepático é o principal local de metabolismo da norfloaxacin enquanto a urina é a principal via de excreção e seis metabólitos da norfloxacin são excretados não conjugados na urina (PAULIUKONIS et al., 1984). A droga é altamente lipossolúvel, mas exibe baixas propriedades de ligação a proteínas (STEIN, 1987), o que diminui sua disponibilidade quando administrada por via oral.

Embora o metabolismo da norffloxacin se dá em sua maioria no fígado, as principais lesões patológicas encontradas como efeito colateral são as alterações renais, principalmente nefrites intersticiais, devido a ligação de antígenos no rim ou metabólitos que atuam como antígenos que são então depositados no interstício, induzindo uma reação imune (NAUGHTON, 2008).

2. Sistemas de liberação e carreadores nanoestruturados

Uma das formas de que tem sido pesquisada para potencialização de fármacos e diminuição de seus respectivos efeitos colaterais tem sido a utilização de sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos, onde ocorre a associação da molécula do fármaco a uma estrutura vesicular composta de uma bicamada lipídica com um núcleo aquoso bem definido (BANGHAM & HORNE, 1964).

Dentro dessa estrutura os lipossomas podem carrear drogas hidrofílicas no núcleo aquoso e aumentar a penetração através das membranas fisiológicas lipofílicas, enquanto as drogas lipofílicas estão contidas dentro da bicamada lipídica e aumentam sua solubilidade nos fluidos corporais aquosos (RAHMAN et. al., 1974). Tal mecanismo potencializa o efeito de ação dos fármacos, além de melhorar a resistência das moléculas a enzimas de degradação (CHAIZE et al., 2004) e sua composição a partir de materiais naturais torna a formulação mais biocompatível com o organismo e biodegradável (VAN ROOIJEN & VAN NIEUWMEGEN, 1980).

Os primeiros lipossomas sintetizados apresentavam algumas desvantagens, pois a produção era complexa, tendo menos estabilidade inerente e, portanto, não podiam ser armazenados por muito tempo. Entretanto com objetivo de superar essas limitações, novas gerações de lipossomas foram produzidas com extensas modificações em suas estruturas de superfície, tamanho e mecanismo de disposição molecular, resultando em alta estabilidade mecânica, capacidade de induzir ou inibir a ação de componentes do sistema imunológico, tempos de circulação mais longos, e eficiência de carregamento penetração e especificidade do alvo aprimorados (MADNI et. al, 2014).

Várias classes de antibióticos foram encapsuladas com sucesso em lipossomas, melhorando seu potencial de ação e diminuindo efeitos colaterais, como a rifampicina (DEOL et al., 1997), ceftiofur (LIU et al., 2011), tobramicina (ALHARIRI & OMRI, 2013), vancomicina (MUPPIDI et al., 2012), ciprofloaxina (HOSNY, 2010), polimixina B (ALIPOUR et al., 2008), claritromicina (ALHAJLAN et al., 2013), gentamicina (RUKHOLM et al., 2006), meropenem (DRULIS-KAWA et al., 2006), benzilpenicilina (KIM & JONES, 2004), amicacina (LEITZKE et al.,

1998), rifabutina (GASPAR et al., 2008), norfloxacin (AHMAD et al., 2016) e pefloxacin (PUGLISI et al., 1995).

Existem vários métodos de preparação dos lipossomas carreadores de antibióticos, dentre eles os principais são os métodos de desidratação-reidratação, evaporação de fase reversa, método de injeção, método da remoção por detergentes, sonicação, extrusão e microfluidização, sendo cada um aplicável em função do tipo de lipossoma utilizado e do fármaco que se deseja adicionar a estrutura (ALHARIRI et al., 2013).

3. Pectina

A pectina é um termo geral para um grupo de polímeros naturais que ocorrem como materiais estruturais em todas as plantas de cultivo de terra. Faz parte, portanto, da natureza dieta humana. A pectina comercial é obtida da casca de frutas cítricas ou do bagaço de maçã (ROLIN & DE VRIES, 1990).

A pectina tem sido amplamente descrita como uma matriz de biopolímero para entrega de drogas (RIBEIRO et al., 2014), devido à sua resistência ao meio de baixo pH e a capacidade de interagir com a mucina, o principal glicoproteína de tecidos mucosos, o que torna a pectina um excelente mucoaderente (SRIAMORNSAK, 2011, LI et al., 2021) e um aliado no sistema de entrega de fármacos (LI et al., 2021; KEDIR et al., 2022).

A pectina tem sido usada encapsulando vários fármacos sendo alianada no tratamento de diversas doenças com atividade anticancer, antidiabética, antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, imunomodulatória, na regulação do colesterol (KEDIR et al., 2022).

4. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

A *Pseudomonas aeruginosa* (PA) é uma bactéria gram-negativa, oportunista e notadamente identificada como um patógeno multirresistente a medicamentos

e com grande necessidade de desenvolvimento de novos métodos terapêuticos para seu combate (WILSON & PANDEY, 2022).

Dentre as 5000 cepas de PA já conhecidas a PAO1 tem sido uma das mais utilizada como referência para experimentos laboratoriais por facilitar a padronização de novas drogas e testar novos protocolos terapêuticos, devido a padronização dos experimentos e conhecimento genômico em relação a cepa (GRACE et al., 2022). Dentre as principais características que justificam a utilização da PAO1 como cepa de pesquisa estão a resistência a cloranfenicol, a existência de um sequenciamento genético e identificação de seus genes ativos, a eficácia na infecção de diferentes organismos experimentais e formação de biofilme (RAJKUMARI et al., 2018).

A PA causa muitas infecções agudas e crônicas com taxas de morbidade e mortalidade de até 40% no caso de humanos (ENGEL, 2003). PA deve sua versatilidade patogênica a um grande arsenal de fatores de virulência que permitem que esse patógeno colonize vários locais dentro dos hospedeiros e a proteja das defesas imunes inatas do hospedeiro (MOHAMED et al., 2022). A indução de citotoxicidade em células hospedeiras-alvo é uma principal estratégia de virulência para PA durante o curso da infecção, manifestada por uma infinidade de citotoxinas que podem induzir várias formas de morte celular em células hospedeiras-alvo. Logo após a infecção, onde o número de bactérias é menor, a PA é vulnerável, portanto, pode preferir implantar citotoxinas indutoras de apoptose como forma de permanecer invisível ao sistema imune, dada a natureza anti-inflamatória do apoptose (ROH & SOHN, 2018). No entanto, as mortes celulares apoptóticas geradas pela PA são mais comuns durante o início da infecção, pois à medida que o número de bactérias aumenta, é inevitável que o hospedeiro reconheça e monte respostas imunes efetiva. Quando as condições de infecção evoluem e o agente se estabelece no organismo, PA pode preferir usar toxinas necróticas e formadoras de poros de ação rápida, como alternativa para eliminar a ameaça representada pelos leucócitos fagocíticos do hospedeiro. Além disso, outros fatores químicos e/ou físicos (ambiente aeróbico ou anaeróbico, tecido ou sangue, presença ou ausência de cofatores, pH, etc.), também podem influenciar a escolha das citotoxinas que serão produzidas durante a infecção por PA (WOOD et al., 2023).

Em roedores os principais mecanismos patogênicos da PA PAO1 são a capacidade de aderência nos tecidos, a produção de exotoxinas (principalmente a exotoxina A ETA) e exoenzimas (exoenzima S, proteases e fosfolipase) tóxicas, produção de sideróforos, características que induzem o animal a uma produção intensa de imunocomplexos, lesão celular no local de instalação da bactéria e evolução para septicemia (HIRAKATA et al., 1993; DIAZ-PEREZ et al., 2022).

Embora mutações genéticas e variações fenotípicas tenham aparecido devido a inconsistências na manutenção das colônias de cepas padronizadas em laboratório, existem métodos para reduzir a variabilidade genômica e fenotípica (CHANDLER et al., 2019). A utilização de cepas padronizadas como a PAO1 diminui o efeito do agente utilizado na qualidade dos resultados, pois a utilização de cepas não padronizadas pode interferir nos resultados obtidos. (FRIMMERSDORF et al., 2010; POULSEN et al., 2019; MANZO et al., 2021).

CAPÍTULO 2

O artigo será submetido a revista Pharmaceutics

Therapeutic evaluation of a hybrid nanocomposite based on liposome and pectin for sustained release of norfloxacin in infected mice (*Mus musculus*)

Schlemper, André Eduardo ^{1*}; Ribeiro, Lígia Nunes de Moraes^{1#}; Sommerfeld, Simone ¹; Medeiros-Ronchi, Alessandra Aparecida¹; Silva, Murilo Vieira¹; Fonseca, Belchiorina Beatriz¹;

¹ UFU – Federal University of Uberlândia;

* Correspondence: aeschlemper@gmail.com; Tel: +55 49 999258124

These authors contributed equally and thus, they share the first authorship

Abstract: This study evaluated the efficacy of a nanohybrid formulation of liposome, pectin and norfloxacin (PEC@LUVNOR) in C57/6 mice experimentally infected with *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PA PAO1). After using dexamethasone, we infected 86 mice with PA PO1 and initiated the treatment 24 hours post-infection (pi). We used different therapeutic and subtherapeutic doses (20 and 5mg/Kg) beside two dose interval schedules (single dose – 24 hours pi and two doses – 24 and 72 hours pi) of PEC@LUV/NOR via gavage. As positive control we treated the mice with commercial norfloaxacin. The results showed high efficiency of the lower doses of the PEC@LUVNOR compared to commercial norfloxacin. Besides, the treatment with PEC@LUVNOR resulted in ease of drug administration due to longer intervals between doses. The PEC@LUVNOR is a potent formulation even in a low dose of norfloxacin. Our reults indicated that the PEC@LUV/NOR nanohybrid formulation is an alternative with great potential for replacing traditional formulations.

Keywords: nanotechnology, antibiotics resistanc, less side effect;

1.Introduction

The use of antibiotics encapsulated in liposomal particles has a significant advantage in protecting the drug against degradation, prolonging release and reducing the side effects resulting from its metabolism (DRULIS-KAWA & DOROTKIEWICZ-JACH, 2009). In addition, such system, presents the potential to optimize the therapeutic efficacy of the active molecule in the organism (RIBEIRO et. al, 2020).

The use of formulations that enhance antibiotics are promising alternative to combat one of the most significant biological dangers that have been exposed in our time, the increase in antimicrobial resistance by parts of the bacteria and the generation of the so-called super bacteria (ROCHA et. al, 2019). Drugs can also be associated with polymers to enhance their physicochemical and pharmacological features, improving the specificity of their action in certain situations (RIBEIRO et. al, 2020). Among the polymers used, pectin is a heteropolysaccharide from terrestrial plants, which has been used as an excellent matrix for drug delivery (ROLIN & DE VRIES, 1990; RIBERO et al., 2014). The mucoadhesive property combined with resistance to the acid pH of the stomach, which increases the stability of drug bound, gives pectin the advantage of improving drug delivery (SRIAMORNSAK, 2011).

The PEC@LUV/NOR formulation comprises a nanohybrid formulation of liposomal norfloxacin and pectin. The minimum inhibitory concentration (MIC) decreased in different species of bacteria treated with PEC@LUVNOR and there was an extension of the drug release profile (RIBEIRO et. al, 2020). In addition, the toxicity analysis in the *in vivo* embryonic model, showed the innocuousness of the developed nanoformulation. In the present manuscript, we tested the formulation in C57/6 mice infected by *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 (PA PAO1) with the aim of evaluating the efficiency of the PEC@LUVNOR and side effects in kidneys.

2. Material and Methods

This research was developed in the Infectious Diseases Laboratory (LADOC-UFU), Central Bioterium of the Integrated Animal Facility Network (REBIR/UFU), Animal Pathology Laboratory (PAVET-UFU) and Nanobiotechnology Laboratory Dr. Luiz Ricardo Goulart (NANOS/ICTEB-UFU). The research was evaluated and approved by the Ethics and Research with Animals Committee of the Federal University of Uberlândia under number 047/21.

2.1 PEC@LUV/NOR

We produced PEC@LUV/NOR 0.2% in Nanobiotechnology Laboratory (NANOS) as standardized in Ribeiro et al. (2020). The components used were egg phosphatidylcholine (EPC), cholesterol (Chol), α -tocopherol, apple pectin (PCT) and norfloxacin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and deionized water (18 M Ω) (Elga LabWater, High Wycombe, UK). All reagents were analytical or pharmaceutical grade.

2.2 Comercial Norfloaxin

The commercial norfloxacin formulations were obtained (Exata Vet Farmácia de Manipulação Veterinária, Uberlândia/MG) at concentrations of 5mg/ml and 20mg/ml in oral suspension presentation.

2.3 Infectious agent

We infected the mice with PA PO1. It is a reference strain utilized in therapeutic research (GRACE et. al, 2022). The inoculum was obtained from replication in agar MacConkey and serial dilution at the Laboratory of Infectious Diseases (LADOC-UFU).

2.4 Experimental animals

A total of 86 male C57/6 mice, 4 to 5 weeks old, from the Central Bioterium of University of Uberlândia (REBIR/UFU) were used. During the experiment, the animals were kept at the REBIR/UFU under appropriate technical management conditions, with water and food *ad libitum*, separated into uniform groups kept in boxes suitable for their maintenance in groups of 3 or 4 animals as recommended by the technical standards of REBIR/UFU. The animals were divided in followed experimental groups:

GROUP 1 (G1) - 8 animals inoculated with distilled water and treated with placebo (water);

GROUP 2 (G2) - 8 animals inoculated with PA PAO 1 and treated with placebo (water);

GROUP 3 (G3) - 8 animals inoculated with PA PAO 1 and treated with commercial norfloxacin dose 20mg/kg once a day in a single day (single dose);

GROUP 4 (G4) - 8 animals inoculated with PA PAO 1 and treated with commercial norfloxacin dose 20mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation);

GROUP 5 (G5) - 8 animals inoculated with PA PAO 1 and treated with commercial norfloxacin dose 5mg/kg once a day in a single day (single dose);

GROUP 6 (G6) -8 animals inoculated with PA PAO 1and treated with commercial norfloxacin dose 5mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation);

GROUP 7 (G7) -8 animals inoculated with PA PAO 1and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 20mg/kg in a single day (single dose);

GROUP 8 (G8) -8 animals inoculated with PA PAO 1and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 20mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation);

GROUP 9 (G9) -8 animals inoculated with PA PAO 1and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 5mg/kg in a single day (single dose);

GROUP 10 (G10) - 8 animals inoculated with PA PAO 1and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 5mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation);

GROUP 11 (G11) – 6 animals inoculated with PA PAO 1and treated with commercial norfloxacin 20mg/kg for 7 days;

The *in vivo* assays were carried out in the procedure room at REBIR/UFU by professionals trained and capable of handling experimental animals.

2.5 Agent inoculation

The animals were received at about - 4 weeks old and kept for 14 days in acclimatization, separated in the boxes of their respective groups. After 14 days, all animals were exposed to prior immunosuppression using 50mg/kg of dexamethasone administered intramuscularly for 3 days. Then, the animals in G1 were inoculated with 0.2ml of distilled water intraperitoneally using a 1ml syringe and a 26G disposable needle. The animals in groups 2-11 were infected with 0,2ml of diluted solution of PA PAO 1 at 4.08 log CFU/animal intraperitoneally using a 1ml syringe and 26G disposable needle.

2.6 Treatments

The animals were treated orally according to the protocol for each group (24 and/or 72 hours post-infection (pi)) using a 1ml disposable syringe and a reusable metallic gavage probe. From the infection of bacteria and during 7 days, we observed the animals' behavior and mortality. After 7 days of treatment, all animals were euthanized with an overdose of isoflurane in an anesthetic chamber.

2.7 Biological samples

After the euthanasia of the animals (7 days pi), we collected blood by retrobulbar puncture with a non-heparinized capillary tube and stored in a sterile plastic microtube for further analysis.

Then, we performed the necropsy of the animals and collected the kidneys in 10% formaldehyde for later histopathological examination.

2.8 Histopathological analysis

The kidneys were dehydrated in alcohol, cleared in xylene, included in paraffin, and stained with Hematoxylin and Eosin. Two experienced pathologists analyzed all slides from kidney samples without knowing the treatment group. Then, the lesions were identified and scored for severity, and the slides for the control group were identified and re-evaluated for normality. The negative control samples (G1) were used to guide the normal histological appearance and the natural rate of lesion occurrence.

All slides were re-examined compared to the normal slide to ensure accurate recognition and grading of lesions. All kidneys' slides were examined microscopically for histological evidence of vacuolar-hydropic degeneration, necrosis and detachment of renal tubular epithelial (RTE) cells from the basement membrane, inflammation and circulatory lesions. Severity scores were based on a scale of 0 to 3, which corresponded to normal, mild, moderate, and severe, respectively. Vacuolar-hydropic degeneration was scored as follows: 0= no detectable cytoplasmic vacuolation; 1= scattered individual vacuoles or low numbers of vacuoles within the cytoplasm of some tubular epithelial cells; 2= clusters of vacuoles within the cytoplasm of many some tubular epithelial cells; 3= clearing of the cytoplasm because of advanced vacuolation in nearly all some tubular epithelial cells. We didn't perform histopathological analysis in G11 because the number of animals were lower.

2.9 Statistical analysis

We tested the histopathological changes (damage score) by ANOVA with the non-parametric Kruskal-Wallis test. For the analysis of clinical signs, we used the chi-square test followed by the difference between two proportions comparing each value with negative control. We considered a statistical difference to a p-value $\leq 5\%$ using a GraphPad Prism 9.1 program.

3. Results

3.1 Behavior assessment

After treatment for immunosuppression, the animals were inoculated with PA PAO1 and their behavior was evaluated to identify possible clinical signs (prostration, anorexia, apathy) based on the assessment carried out by a trained professional and compatible with the onset of bacterial infection (Table 1).

Table 1: Signs and mortality (%) of mice inoculated with *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 and treated with PEC@LUV/NOR in different dosage schemes

Groups	INFECTION DAY	Day 1 pi	Day 2 pi	Day 3 pi	Day 4 pi	Day 5, 6, 7 pi
G1	S: 0% (0/8)a	S: 0% (0/8)a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8)	S: 0% (0/8)a
G2	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 100% (8/8)b	S: 75% (6/8) b	S: 0% (0/8). M: 12.5% (1/8)	S: 0% (0/8) a
G3	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8)	S: 0% (0/8) a
G4	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8)	S: 0% (0/8) a
G5	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 100% (8/8) b	S: 50% (4/8) ab	S: 0% (0/8)	S: 0% (0/8) a
G6	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 50% (4/8) ab	S: 50% (4/8) ab	S: 0% (0/8) M: 12.5% (1/8)	S: 0% (0/8) a
G7	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8)	S: 0% (0/8) a
G8	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8)	S: 0% (0/8) a
G9	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8)	S: 0% (0/8) a
G10	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8)	S: 0% (0/8) a
G11	S: 0% (0/6) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8) a	S: 0% (0/8)	S: 0% (0/8) a

Pi: post inoculation with *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 (PA PAO1) (first day of treatment). S: animals with symptoms (apathetic, anorexia and prostrate animals). M: Mortality (%). Where the mortality was not described it didn't occur. Different letters in the same column indicate a statistical difference between negative control. We used the Chi-square test followed by the difference between two proportions (comparing each result with negative control). For mortality, we just performed a descriptive analysis. G1: Negative control - 8 animals inoculated with distilled water and treated with placebo; G2: Positive control - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with placebo; G3 - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with norfloxacin dose 20mg/kg SID in a single day (single dose, one day pi of bacteria); G4 - 8 animals

inoculated with PA PAO1 and treated with norfloxacin dose 20mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation); G5 - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with commercial norfloxacin dose 5mg/kg SID in a single day (single dose); G6 - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with commercial norfloxacin dose 5mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation); G7 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 20mg/kg in a single day (single dose); G8 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 20mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation); G9 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 5mg/kg in a single day (single dose); G10 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 5mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation); G11 – 6 animals inoculated with PA PAO1 and treated with commercial norfloxacin 20mg/kg for 7 days;

It was possible to assess that not all animals had a clinical manifestation of the bacterial infection inoculated. However, positive control (G2) and groups treated with the commercial formulation at a minimum dose (5mg/kg) with longer intervals than the usual dosage of the drug (single dose and interval of 24-72h) showed alterations 2 and 3 days pi (table 1). In G2 and G6 there was one death 4th day pi.

3.2 Histopathological results

3.2.1 Circulatory changes

The results obtained after analyzing the histological slides of the mice kidneys showed a statistical difference in the presence of circulatory lesions (Figure 1) in G4 (treated with commercial Norfloxacin at a dose of 20mg/Kg in two days, 24 and 72 hours pi of the bacteria) compared to groups G1, G2, and G10, and a statistical similarity in the occurrence of these lesions between groups G4- G9. The negative group (G1) was similar to G2, G3, G5-G10.

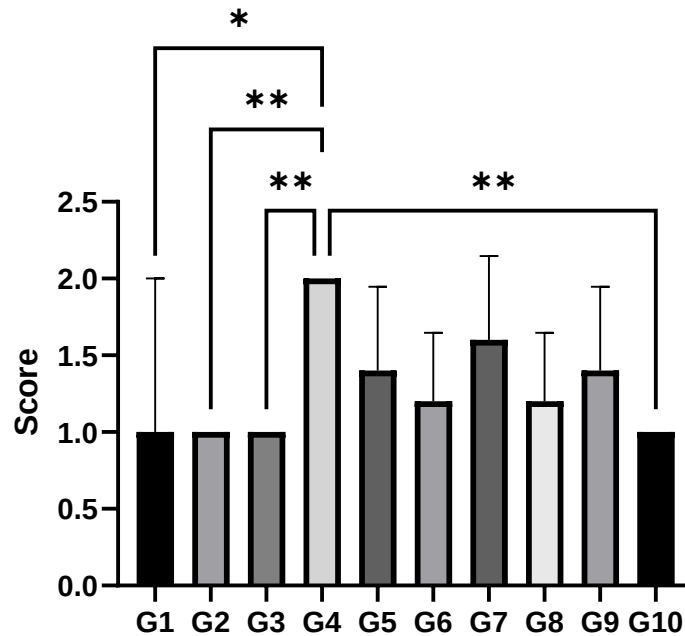


Figure 1: Mean of the circulatory change score in kidney of mice infected by *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 (PA PAO1) and treated with PEC@LUVNOR or commercial norfloxacin. PEC@LUVNOR: *formulation of liposomes, pectin and norfloxacin*. We used ANOVA by Kruskal Wallis test ($p \leq 0.05$). The asterisk indicates a statistical difference. G1: Negative control - 8 animals inoculated with distilled water and treated with placebo; G2: Positive control - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with placebo; G3 - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with norfloxacin dose 20mg/kg SID in a single day (single dose, one day post of bacteria); G4 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with norfloxacin dose 20mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation); G5 - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with commercial norfloxacin dose 5mg/kg SID in a single day (single dose); G6 - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with commercial norfloxacin dose 5mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation); G7 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 20mg/kg in a single day (single dose); G8 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 20mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation); G9 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 5mg/kg in a single day (single dose); G10 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 5mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation).

3.2.2 Hydropic degeneration

The results obtained after analyzing the histological slides of the mouse kidneys showed no statistical difference in the presence of hydropic degeneration lesions (Figure 2).

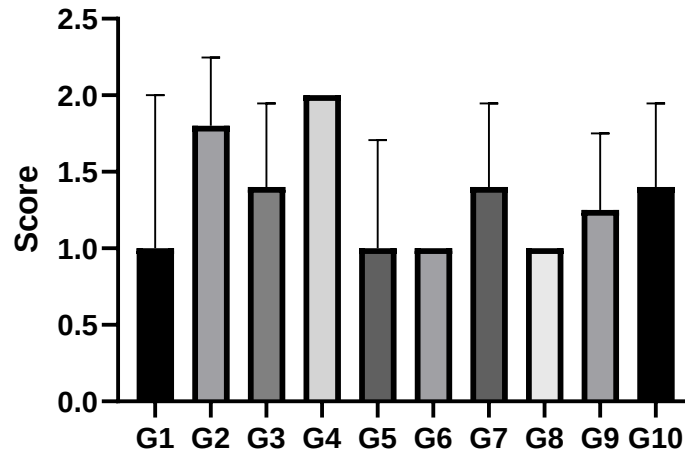


Figure 2: Mean of the hydropic degeneration score in kidney of mice infected by *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 (PA PAO1) and treated with PEC@LUVNOR or commercial norfloxacin. PEC@LUVNOR: formulation of liposomes, pectin and norfloxacin. We used Kruskal Wallis test ($p \leq 0.05$). The asterisk indicates a statistical difference. G1: Negative control - 8 animals inoculated with distilled water and treated with placebo; G2: Positive control - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with placebo; G3 - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with norfloxacin dose 20mg/kg SID in a single day (single dose, one day pi of bacteria); G4 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with norfloxacin dose 20mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation); G5 - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with commercial norfloxacin dose 5mg/kg SID in a single day (single dose); G6 - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with commercial norfloxacin dose 5mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation); G7 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 20mg/kg in a single day (single dose); G8 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 20mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation); G9 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 5mg/kg in a single day (single dose); G10 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 5mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation)

2.3 Necrotic alterations

After analyzing the histological slides of the mouse kidneys, the results showed a statistical difference in the presence of lesions compatible with tubular cell nephrosis (graph 3). The group G1 (negative control) was similar to all groups except G4. The G4 was identical to all groups except G1, G5 and G6.

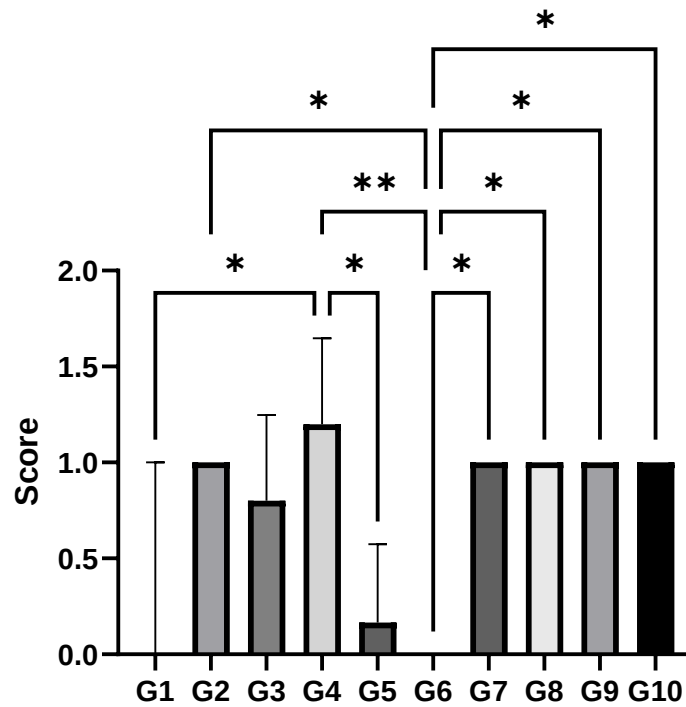


Figure 3: Mean of the necrose score in the kidney of mice infected by *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 (PA PAO1) end treated with PEC@LUVNOR or commercial norfloxacin. PEC@LUVNOR: formulation of liposomes, pectin and norfloxacin We used ANOVA by Kruskal Wallis test ($p \leq 0.05$). The asterisk indicates a statistical difference. G1: Negative control - 8 animals inoculated with distilled water and treated with placebo; G2: Positive control - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with placebo; G3 - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with norfloxacin dose 20mg/kg SID in a single day (single dose, one day pi of bacteria); G4 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with norfloxacin dose 20mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation); G5 - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with commercial norfloxacin dose 5mg/kg SID in a single day (single dose); G6 - 8 animals infected with PA PAO1 and treated with commercial norfloxacin dose 5mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation); G7 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 20mg/kg in a single day (single dose); G8 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 20mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation); G9 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 5mg/kg in a single day (single dose); G10 - 8 animals inoculated with PA PAO1 and treated with PEC@LUV/NOR at a dose of 5mg/kg in two days (24 and 72 hours after bacteria inoculation).

3.2.4 Inflammation alterations

None of the slides analyzed showed inflammatory lesions in the kidneys.

4. Discussion

PEC@LUVNOR was effective in combating bacterial infection by PI PAO1 even when used in lower doses than usual. PI PAO1 infection resulted in moderated clinical signs such as prostration, anorexia and apathy in 50-100% of the animals in G2 (positive control), G5 and G6 (treated with subtherapeutic dose of commercial norfloxacin) at 2 and 3 days pi (table 1). Besides, one animal from G2 and one from G5 died 4 days pi (Table 1).

Extracellular bacteria can induce apoptosis, but PA can also cause cell necrosis (Hauser et al. 1999) and necroptosis (WOOD et al. , 2023). The type of cell death may be important for the immune response (WOOD et al., 2023) and the consequent presentation of clinical symptoms, death, or recovery of the animal. Necrotic cells stimulate the innate immune system. Apoptotic cells are only stimulatory in some situations and in others, apoptosis can evade the immune response (KONO et al., 2009). In our study, the sick mice recovered spontaneously even when untreated. This probably occurred due to the effective immune response of the C57/6 mouse strain, used for research in the field of immunology (SONG & HWANG, 2017), in addition to the concentration of bacteria used in the inoculum was not high enough to lead to the death of the animals. PA has the characteristic of leading to rapid apoptosis of the cells at the site where it is installed, which can facilitate the efficiency of the immune response of individuals before the installation of a septicemic condition that would lead the animal to death (HOTCHKISS et. al, 2001). Such results demonstrated that PEC@LUV/NOR, even at lower dosages and longer intervals, presented equal or better results than the commercial formulation, which characterizes its potential as a more effective treatment alternative and easy to administer.

Even though the animals recovered spontaneously in our study, we could conclude that LUV@PECNOR in lower doses (5mg/Kg single or two doses) was efficient in controlling the PA PAO1 since animals treated with commercial norfloxacin in the same dose got sick while the mice treated with LUV@PECNOR was no clinical signs.

In the circulatory evaluation, G4 (exposed to the highest commercial therapeutic dosage of norfloxacin, and the longer therapeutic interval) showed significant circulatory alterations (Figure 1). This probably occurred due to the nephrotoxic effects of the high dose of norfloxacin resulting from the deposition and formation of immune complexes (NAUGHTON, 2008). Our hypothesis is based on the fact that G1 (negative control) resulted in identical to G2 (positive control). So, the circulatory effect in the kidney is probably a consequence of drugs, not bacterial

infection. Our results can indicate the high doses of norfloxacin (in G4) resulted in an increase of circulatory damage in the kidney since we observed a clear statistical difference between negative control (G1).

There was no statistical difference between the animals in the hydropic degenerative evaluation (Figure 2). In some doses, norfloxacin can trigger hydropic degeneration of renal cells groups (NAUGHTON, 2008), but we didn't find this change. Although pathological effects caused by PA infection in the kidneys can happen in tubular cells where apoptosis begins in the case of renal cells with hydropic degeneration and vacuolation of the cell (HOTCHKISS, 2001) probably, in our study, the bacteria didn't reach the kidney.

In the evaluation of necrotic lesions, G4's changes were clear. All groups were similar to the negative control except G4. Besides, G4 was identical to all groups except G1, G5 and G6 (Figure 3).

The action of the norfloxacin in the kidney in our study is clear because the kidney necroses are greater in G4 (animals treated with 20mg/Kg in two doses) compared to G1 (negative control) or G5 and G6 (animals treated with 5mg/Kg of norfloxacin) (Figure 3). It is known that the effects of antibiotic-induced nephrosis are usually manifested after chronic exposure to the agent or overdose (HOITSMA et. al, 1991). In doses of 20mg/Kg of commercial norfloxacin resulted in kidney necrosis. The greater occurrence of lesions in the groups treated with the PEC@LUV/NOR formulation (G9 and G10 were different from G6 and similar to G4) (Figure 3) can be explained by the molecule's ability to increase the agent's release time in the body, even at lower doses.

The evaluation of inflammatory lesions in the kidney blades was also carried out, but in none of them was found any significant alteration. This must be related to the resolution of the bacterial infection quickly, before the release of cytokines in the kidney, installation of a septic condition, or exacerbated and chronic formation of immune compounds that could lead to renal inflammation (HOTCHKISS, 2001). Kidney inflammation occurs when an injury affects the tissues, triggering cell lysis, the release of inflammatory mediators and the consequent aggregation of defense cells (ROVIN & PHAN, 1998).

Our results, as a whole, make clear the great potential of using PEC@LUVNOR for bacterial treatment. However, the subtherapeutic dose used in this study (5mg/Kg) must still be high. Liposome-enhanced drugs show better release and we increased the intestinal absorption of norfloxacin using pectin in the PEC@LUVNOR formulation. The presence of animals without signs treated with subtherapeutic doses of PEC@LUVNOR associated with the necrosis in kidney compared to the group treated with the same dose of norfloxacin (G6), makes it clear that the

formulation met the proposed objectives (lower dosage, more significant action). However, we have not yet been able to find the ideal dose.

The PEC@LUV/NOR formulation showed therapeutic efficacy even at a dose 4 times fewer than commercial norfloxacin. However, other tests should be performed with lower doses than those evaluated in this study. Thus, we can find an efficient and safe dosage of PEC@LUVNOR.

REFERÊNCIAS

ADHAMI, Z. N. et al. The pharmacokinetics and tissue penetration of norfloxacin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 13, n. 1, p. 87-92, 1984. DOI: 10.1093/jac/13.1.87

AHMAD, Iqbal et al. Formulation and stabilization of norfloxacin in liposomal preparations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 208-215, 2016. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.05.017

ALHAJLAN, Mai; ALHARIRI, Moayad; OMRI, Abdelwahab. Liposomal Clarithromycin: Effectiveness, Safety and Modulation of Pseudomonas aeruginosa Virulence Factors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC. 00235-13, 2013. DOI: 10.1128/AAC.00235-13

ALHARIRI, Moayad; AZGHANI, Ali; OMRI, Abdelwahab. Liposomal antibiotics for the treatment of infectious diseases. **Expert opinion on drug delivery**, v. 10, n. 11, p. 1515-1532, 2013. DOI: 10.1517/17425247.2013.822860

ALHARIRI, Moayad; OMRI, Abdelwahab. Efficacy of liposomal bismuth-ethanedithiol-loaded tobramycin after intratracheal administration in rats with pulmonary Pseudomonas aeruginosa infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 569-578, 2013. DOI: 10.1128/AAC.01634-12

ALIPOUR, Misagh et al. Antimicrobial effectiveness of liposomal polymyxin B against resistant Gram-negative bacterial strains. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1-2, p. 293-298, 2008. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.11.035

BANGHAM, Alec D.; HORNE, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. **Journal of molecular biology**, v. 8, n. 5, p. 660-IN10, 1964. DOI: 10.1016/S0022-2836(64)80115-7

BENTLEY, Ronald; BENNETT, J. W. What is an antibiotic? Revisited. **Advances in applied microbiology**, v. 52, p. 303-332, 2003. DOI: 10.1016/S0065-2164(03)01012-8

CANTARERO-ARÉVALO, Lourdes; HALLAS, Mia Pavelics; KAAE, Susanne. Parental knowledge of antibiotic use in children with respiratory infections: a

systematic review. **International Journal of Pharmacy Practice**, v. 25, n. 1, p. 31-49, 2017. DOI: 10.1111/ijpp.12337

CHAIZE, Barnabé et al. Encapsulation of enzymes in liposomes: high encapsulation efficiency and control of substrate permeability. **Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 67-75, 2004. DOI: 10.1081/BIO-120028669a

CHANDLER, Courtney E. et al. Genomic and phenotypic diversity among ten laboratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of bacteriology**, v. 201, n. 5, p. e00595-18, 2019. DOI: 10.1128/JB.00595-18

DEOL, Parampal; KHULLER, G. K.; JOSHI, K. Therapeutic efficacies of isoniazid and rifampin encapsulated in lung-specific stealth liposomes against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 6, p. 1211-1214, 1997. DOI: 10.1128/AAC.41.6.1211

DÍAZ-PÉREZ, Sharel Pamela et al. Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm-associated is dependent on the pyoverdine and pyocyanin siderophores by quorum sensing modulation. **Microbial Ecology**, p. 1-15, 2022. DOI: 10.1007/s00248-022-02095-5

DONG, Zhao et al. Preparation and in vitro, in vivo evaluations of norfloxacin-loaded solid lipid nanoparticles for oral delivery. **Drug Delivery**, v. 18, n. 6, p. 441-450, 2011. DOI: 10.3109/10717544.2011.577109

DRULIS-KAWA, Zuzanna et al. In vitro antimicrobial activity of liposomal meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* strains. **International journal of pharmaceuticals**, v. 315, n. 1-2, p. 59-66, 2006. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.02.017

DRULIS-KAWA, Zuzanna; DOROTKIEWICZ-JACH, Agata. Liposomes as delivery systems for antibiotics. **International journal of pharmaceuticals**, v. 387, n. 1-2, p. 187-198, 2010. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.11.033

ENGEL, Joanne N. Molecular pathogenesis of acute *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Severe infections caused by *Pseudomonas aeruginosa***, p. 201-229, 2003. DOI: 10.1007/978-1-4615-0433-7_13

FONSECA, Belchiolina Beatriz et al. Nanocomposite of Ag-Doped ZnO and AgO nanocrystals as a preventive measure to control biofilm formation in eggshell and salmonella spp. Entry into eggs. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 217, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00217

FRIMMERSDORF, Eliane et al. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1734-1747, 2010. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02253.x

FUKUDA, H. et al. New norfloxacin resistance gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 9, p. 1757-1761, 1990. DOI: 10.1128/AAC.34.9.1757

GASPAR, M. M. et al. Rifabutin encapsulated in liposomes exhibits increased therapeutic activity in a model of disseminated tuberculosis. **International journal of antimicrobial agents**, v. 31, n. 1, p. 37-45, 2008. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2007.08.008

GÓRNIAC, Silvana Lima, Sulfas, Quinolonas e Outros Quimioterápicos Anti-infecciosos in: SPINOSA, Helenice de Souza; GÓRNIAC, Silvana Lima; BERNARDI, Maria Martha. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 2006.

GRACE, Amber et al. Pseudomonas aeruginosa reference strains PAO1 and PA14: A genomic, phenotypic, and therapeutic review. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1023523

HAUSER, Alan R.; ENGEL, Joanne N. Pseudomonas aeruginosa induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 67, n. 10, p. 5530-5537, 1999. DOI: 10.1128/IAI.67.10.5530-5537.1999

Hirakata Y, et al. In vivo production of exotoxin A and its role in endogenous Pseudomonas aeruginosa septicemia in mice. **Infect Immun**. 61(6):2468-2473 1993. DOI: :10.1128/iai.61.6.2468-2473.1993

HOITSMA, Andries J.; WETZELS, Jack F. M.; KOENE, Robert A. P. Drug-Induced Nephrotoxicity Aetiology, Clinical Features and Management. **Drug Safety**, v. 6, n. 2, p. 131-147, 1991. DOI: 10.2165/00002018-199106020-00004.

HOLMES, B.; BROGDEN, R. N.; RICHARDS, D. M. Norfloxacin: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. **Drugs**, v. 30, p. 482-513, 1985. DOI: 10.2165/00003495-198530060-00003

HOSNY, Khaled Mohamed. Ciprofloxacin as ocular liposomal hydrogel. **Aaps Pharmscitech**, v. 11, n. 1, p. 241-246, 2010. DOI: 10.1208/s12249-009-9373-4

HOTCHKISS, R. S. Role of Apoptosis in Pseudomonas aeruginosa Pneumonia. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1783a—1783, 2001. DOI: 10.1126/science.294.5548.1783a.

KEDIR, Welela Meka; DERESA, Ebisa Mirete; DIRIBA, Tamiru Fayisa. Pharmaceutical and drug delivery applications of pectin and its modified nanocomposites. **Heliyon**, p. e10654, 2022. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e10654

KIM, Hee-Jeong; JONES, Malcolm N. The delivery of benzyl penicillin to Staphylococcus aureus biofilms by use of liposomes. **Journal of liposome Research**, v. 14, n. 3-4, p. 123-139, 2004. DOI: 10.1081/lpr-200029887

KONO, Hajime; ROCK, Kenneth L. How dying cells alert the immune system to danger. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 4, p. 279-289, 2008. DOI: 10.1038/nri2215

KOURKOUTA, L. et al. History of antibiotics. **Sumerian J Med Healthcare**, v. 1, p. 51-5, 2018.

KURTS, Christian et al. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 10, p. 738-753, 2013.

LEITZKE, S. et al. Rationale for and efficacy of prolonged-interval treatment using liposome-encapsulated amikacin in experimental *Mycobacterium avium* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 459-461, 1998. DOI: 10.1128/AAC.42.2.459

LI, De-qiang et al. Pectin in biomedical and drug delivery applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 49-65, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.088

LINDGREN, Patricia Komp et al. Biological cost of single and multiple norfloxacin resistance mutations in *Escherichia coli* implicated in urinary tract infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2343-2351, 2005. DOI: 10.1128/AAC.49.6.2343-2351.2005

LIU, S. et al. Preparation and pharmacokinetics of ceftiofur sodium liposomes in cows. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 34, n. 1, p. 35-41, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2010.01190.x

LOVULLO, Eric D.; SCHWEIZER, Herbert P. *Pseudomonas aeruginosa* mexT is an indicator of PAO1 strain integrity. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 139, 2020. DOI: 10.1099/jmm.0.001128

MADNI, Asadullah et al. Liposomal drug delivery: a versatile platform for challenging clinical applications. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 401-426, 2014. DOI: 10.18433/J3CP55

MANZO, Giorgia et al. Impacts of metabolism and organic acids on cell wall composition and *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to membrane active antimicrobials. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 8, p. 2310-2323, 2021. DOI: 10.1021/acsinfecdis.1c00002

MOHAMED, Mohamed F. et al. CrkII/Abl phosphorylation cascade is critical for NLRC4 inflammasome activity and is blocked by *Pseudomonas aeruginosa* ExoT. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 1295, 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-28967-5

MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, p. 4.2. 15, 2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015

MUPPIDI, Krishna et al. Development and stability studies of novel liposomal vancomycin formulations. **International Scholarly Research Notices**, v. 2012, 2012. DOI: 10.5402/2012/636743

NAUGHTON, Cynthia A. Drug-induced nephrotoxicity. **American family physician**, v. 78, n. 6, p. 743-750, 2008.

NICOLAOU, Kyriacos C.; RIGOL, Stephan. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. **The Journal of antibiotics**, v. 71, n. 2, p. 153-184, 2018. DOI: 10.1038/ja.2017.62

NORRBY, S. Ragnar. Norfloxacin: Targeted Antibiotic Therapy: Proceedings of a Workshop Held in Taormina, Sicily 11 April, 1986. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. suppl48, p. 1-91, 1986. DOI: 10.3109/inf.1986.18.suppl-48.01

PAULIUKONIS, L. T.; MUSSON, D. G.; BAYNE, W. F. Quantitation of norfloxacin, a new antibacterial agent in human plasma and urine by ion-pair reverse-phase chromatography. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 73, n. 1, p. 99-102, 1984. DOI: 10.1002/jps.2600730126

POULSEN, Bradley E. et al. Defining the core essential genome of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 20, p. 10072-10080, 2019. DOI: 10.1073/pnas.1900570116

PUGLISI, Giovanni et al. Formulation parameters of fluoroquinolone-loaded liposomes and in vitro antimicrobial activity. **International journal of pharmaceuticals**, v. 118, n. 1, p. 65-76, 1995. DOI: 10.1016/0378-5173(94)00340-B

RAHMAN, Y. E. et al. Preparation and prolonged tissue retention of liposome-encapsulated chelating agents. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 83, n. 4, p. 640-647, 1974. DOI: 10.5555/uri:pii:002221437490015

RAJKUMARI, Jobina et al. Cinnamic acid attenuates quorum sensing associated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Biotechnology letters**, v. 40, p. 1087-1100, 2018. DOI: 10.1007/s10529-018-2557-9

RIBEIRO, Lígia NM et al. Pectin-coated chitosan–LDH bionanocomposite beads as potential systems for colon-targeted drug delivery. **International journal of pharmaceuticals**, v. 463, n. 1, p. 1-9, 2014. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.035

RIBEIRO, Lígia Nunes de Morais et al. Hybrid pectin-liposome formulation against multi-resistant bacterial strains. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 769, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12080769

ROCHA, Antônio José et al. *Pseudomonas aeruginosa*: virulence factors and antibiotic resistance genes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019. DOI: 10.1590/1678-4324-2019180503

ROH, Jong Seong; SOHN, Dong Hyun. Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. **Immune network**, v. 18, n. 4, 2018. DOI: 10.4110/in.2018.18.e27

ROLIN, Claus; DE VRIES, Joop. Pectin. In: **Food gels**. Springer, Dordrecht, 1990. p. 401-434. DOI: 10.1007/978-94-009-0755-3_10

ROVIN, Brad H.; PHAN, Lan T. Chemotactic factors and renal inflammation. **American journal of kidney diseases**, v. 31, n. 6, p. 1065-1084, 1998. DOI: 10.1053/ajkd.1998.v31.pm9631856

RUKHOLM, Gavin et al. Antibacterial activity of liposomal gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*: a time–kill study. **International journal of antimicrobial agents**, v. 27, n. 3, p. 247-252, 2006. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2005.10.021

SONG, Hyun Keun; HWANG, Dae Youn. Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. **Laboratory animal research**, v. 33, p. 119-123, 2017. DOI: 10.5625/lar.2017.33.2.119

SPINOSA, Helenice de Souza; GÓRNIK, Silvana Lima; BERNARDI, Maria Martha. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 2006.

SRIAMORNSAK, Pornsak. Application of pectin in oral drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 8, n. 8, p. 1009-1023, 2011. DOI: 10.1517/17425247.2011.584867

STEIN, Gary E. Review of the bioavailability and pharmacokinetics of oral norfloxacin. **The American Journal of Medicine**, v. 82, n. 6, p. 18-21, 1987. DOI: 10.1016/0002-9343(87)90613-9

VAN ROOIJEN, N.; VAN NIEUWMEGEN, Ria. Liposomes in immunology: multilamellar phosphatidylcholine liposomes as a simple, biodegradable and harmless adjuvant without any immunogenic activity of its own. **Immunological communications**, v. 9, n. 3, p. 243-256, 1980. DOI: 10.3109/08820138009065997

WALLACE, William C. et al. New epidemiology for postoperative nosocomial infections. **The American Surgeon**, v. 66, n. 9, p. 874, 2000.

WILSON, Mina G.; PANDEY, Shivlal. *Pseudomonas aeruginosa*. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2022.

WOOD, Stephen J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxins: Mechanisms of Cytotoxicity and Impact on Inflammatory Responses. **Cells**, v. 12, n. 1, p. 195, 2023. DOI: 10.3390/cells12010195

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. World Health Organization, 2014.

ZAFFIRI, Lorenzo; GARDNER, Jared; TOLEDO-PEREYRA, Luis H. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. **Journal of Investigative Surgery**, v. 25, n. 2, p. 67-77, 2012. DOI: 10.3109/08941939.2012.664099