

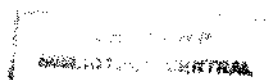
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**SINVALDO BAGLIE**  
FARMACÊUTICO

**BIODISPONIBILIDADE DA AMOXICILINA.  
ESTUDO *EX VIVO*, EM RATOS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências - Área de Farmacologia.

**PIRACICABA - SP  
1998**



2018422

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Este exemplar foi  
devolvido conforme  
CCPE 036/83  
Piracicaba 14/07/98

**SINVALDO BAGLIE**  
FARMACÊUTICO

**BIODISPONIBILIDADE DA AMOXICILINA.  
ESTUDO *EX VIVO*, EM RATOS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba da  
Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências - Área de Farmacologia.

**Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo**

**PIRACICABA - SP  
1998**

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

B146b Baglie, Sinvaldo.  
Biodisponibilidade da amoxicilina. Estudo *ex vivo*, em ratos /  
Sinvaldo Baglie. – Piracicaba, SP : [s.n.], 1998.  
60 f. : il.

Orientador : Francisco Carlos Groppo. .  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Antibióticos beta-lactâmicos. 2. Medicamentos -  
Biodisponibilidade. 3. Microbiologia farmacêutica. 4. Testes de  
sensibilidade bacteriana. I. Groppo, Francisco Carlos. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba. III. Título.

**Índices para o Catálogo Sistemático**

1. Antibióticos beta-lactâmicos.
2. Medicamentos - Biodisponibilidade.
3. Microbiologia farmacêutica.
4. Testes de sensibilidade bacteriana.



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Piracicaba, 26 de Junho de 1998

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Mestrado**, em sessão pública realizada em **26 de Junho de 1998**, considerou o candidato **SINVALDO BAGLIE** aprovado.

1. PROF. DR. FRANCISCO CARLOS GROPPPO

2. PROF. DR. THALES ROCHA DE MATTOS FILHO

3. PROF. DR. ANTONIO CARLOS PIZZOLITTO

---

**AGRADECIMENTOS**

A DEUS, todo poderoso e misericordioso, fonte de toda sabedoria.

**A meus queridos pais GERALDO E NEUSA que pela humildade me fazem enxergar o verdadeiro valor da vida.**

A meus familiares e a meu AMOR pelo constante carinho e incentivo.

---

A FRANCISCO CARLOS GROppo, orientador solícito de todas as horas, incentivador a todo momento e amigo; meu profundo respeito e gratidão.

A THALES ROCHA DE MATTOS FILHO, que em poucas palavras exprime todo o seu conhecimento profissional e de vida.

A EDUARDO DIAS DE ANDRADE, mestre exemplar e grande incentivador.

A PEDRO LUIZ ROSALEN, exemplo de profissionalismo e retidão.

À MARIA CRISTINA VOLPATO, incentivadora e profissional sempre.

A JOSÉ RANALI, pelo incentivo.

---

Aos amigos de mestrado ANA PAULA DEL BORTOLO RUENIS, MARCOS ANTONIO GIROTTI E VALDIR QUINTANA JUNIOR, que juntos passamos por esta importante fase de nossas vidas.

Ao Srs. JOSÉ CARLOS GREGÓRIO e ADEMIR MARIANO, técnicos do Laboratório de Farmacologia, pelo auxílio na fase experimental.

À Srta. MARIA ELISA DOS SANTOS, secretária efficientíssima da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

À Srta. HELOISA MARIA CECCOTTI, bibliotecária da FOP, pela revisão bibliográfica.

À FUNDAÇÃO TROPICAL DE PESQUISAS E TECNOLOGIA "ANDRÉ TOSELLO", através do Sr. ALEXANDRE ROVANI DE SOUZA, por ceder, gentilmente, as amostras de microrganismos utilizadas neste experimento.

À CAPES, Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal Especializado, pela concessão de bolsa de estudo para realização deste trabalho.

Aos amigos e pessoas que embora não citadas colaboraram e incentivaram para que este trabalho fosse realizado.

## SUMÁRIO

	página
<b>1. LISTAS</b>	<b>1</b>
1.1. LISTA DE TABELAS	1
1.2. LISTA DE FIGURAS	2
1.3. LISTA DE ABREVIATURAS	3
<b>2. RESUMO</b>	<b>4</b>
<b>3. INTRODUÇÃO</b>	<b>6</b>
<b>4. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>7</b>
4.1. INFLAMAÇÃO CRÔNICA COMO MODELO DE ESTUDO	7
4.2. A DINÂMICA DA INFECÇÃO	8
4.3. COMO MEDIR A SENSIBILIDADE	9
4.4. O USO CORRETO DE ANTIMICROBIANOS	11
4.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
4.6. AMOXICILINA	14
4.7. FARMACOCINÉTICA DOS ANTIMICROBIANOS	17
4.8. MEDIÇÃO DE NÍVEIS TECIDUAIS DE DROGAS	19
<b>5. PROPOSIÇÃO</b>	<b>22</b>
<b>6. MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>23</b>
6.1. ANIMAIS	23
6.2. MICRORGANISMO	23
6.3. DISCOS	24
6.4. MEIOS DE CULTURA	24
6.5. OBTENÇÃO DO TECIDO GRANULOMATOSO	25
6.6. ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS	25
6.7. OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE $10^8$ u.f.c./mL	26
6.8. OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO	27
6.9. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	28
6.10. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	29
6.11. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE E GRANULOMAS	30
6.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>8. DISCUSSÃO</b>	<b>41</b>
<b>9. CONCLUSÃO</b>	<b>45</b>
<b>10. ANEXOS</b>	<b>46</b>
10.1. ANEXO 1	46
10.2. ANEXO 2	47
10.3. ANEXO 3	48
10.4. ANEXO 4	49
10.5. ANEXO 5	50
<b>11. SUMMARY</b>	<b>51</b>
<b>12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>52</b>



---

## 1. LISTAS

### 1.1. Lista das tabelas presentes no texto.

	página
Tabela 1 Concentração de amoxicilina em $\mu\text{g/mL}$ presente nos tubos na determinação da CIM.	<b>29</b>
Tabela 2 Médias de peso úmido e seco, em gramas ( $\pm$ erro padrão da média) dos tecidos granulomatosos, para os diferentes períodos de estudo.	<b>33</b>
Tabela 3 Diâmetros dos halos de inibição correlacionados com as concentrações de amoxicilina pelas quais foram obtidos.	<b>34</b>
Tabela 4 Valores médios dos halos de inibição e concentrações calculadas de amoxicilina, nos períodos para as amostras de sangue.	<b>36</b>
Tabela 5 Valores médios dos halos de inibição e concentrações calculadas de amoxicilina em $\mu\text{g/g}$ nos períodos para os tecidos granulomatosos.	<b>38</b>
Tabela 6 Valores de peso úmido (em mg) para cada tecido granulomatoso, provindos dos animais e a média dentro de cada grupo.	<b>47</b>
Tabela 7 Valores de peso seco (em mg) para cada tecido granulomatoso, provindos dos animais e a média dentro de cada grupo.	<b>48</b>
Tabela 8 Valores dos halos de inibição (em mm) para cada amostra de sangue e a média dentro de cada grupo.	<b>49</b>
Tabela 9 Valores dos halos de inibição (em mm) para cada tecido granulomatoso e a média dentro de cada grupo.	<b>50</b>

## 1.2. Lista das figuras presentes no texto.

	página
Figura 1 Agulha utilizada para introdução do fármaco por via intra-gástrica.	<b>26</b>
Figura 2 Representação gráfica dos valores médios dos diâmetros dos halos de inibição, em função dos logaritmos das quantidades de antimicrobiano empregadas e a equação da regressão.	<b>35</b>
Figura 3 Representação gráfica dos valores médios do diâmetro do halo de inibição e concentrações calculadas por meio da curva de calibração, nas diferentes dosagens, para as amostras de sangue dos animais.	<b>37</b>
Figura 4 Representação gráfica dos valores médios do diâmetro do halo de inibição e concentrações calculadas por meio da curva de calibração, nas diferentes dosagens, para as amostras de tecido granulomatoso dos animais.	<b>39</b>
Figura 5 Representação gráfica dos valores de concentração em função do tempo decorrido, correlacionado com os valores de CIM e CBM.	<b>40</b>
Figura 6 Detalhe (figura 5) da representação gráfica dos valores de concentração em função do tempo decorrido, correlacionado com os valores de CIM e CBM.	<b>40</b>

## 1.3. Lista das abreviaturas presentes no texto:

%	por cento
&	e
±	mais ou menos
µg	micrograma
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
ASC	área sob a curva
ATCC	American Type Culture Collection (coleção de culturas padrão americana)
BHI	brain heart infusion (infuso de cérebro coração)
CBM	concentração bactericida mínima
CIM	concentração inibitória mínima
cm	centímetro
C <sub>máx</sub>	concentração máxima
e.p.m.	erro padrão da média
et al.	e outros
g	grama
g/dia	grama por dia
h	hora
mg	miligrama
mg/kg	miligrama por quilograma
mg/kg/dia	miligrama por quilograma por dia
mg/L	miligrama por litro
MHA	Mueller Hinton agar (ágar Mueller Hinton)
MHB	Mueller Hinton broth (caldo Mueller Hinton)
microrganismos/mL	número de microrganismos por mililitro
min	minuto
mm	milímetro
nm	nanometro
°C	graus Celsius
pH	logaritmo negativo da concentração hidrogeniônica
PVC	policlorovinil
S.P.F.	specific pathogen free (livre de patógenos específicos)
rpm	rotações por minuto
T <sub>1/2</sub>	tempo de meia vida
TSA	tryptone soya agar (ágar triptona soja)
u.f.c.	unidades formadoras de colônias
u.f.c./mL	unidades formadoras de colônias por mililitro

## 2. RESUMO

Embora existam vários relatos a respeito da resistência bacteriana à amoxicilina, são várias as situações, na Medicina e na Odontologia, onde seu emprego é tido como de primeira escolha. Este fármaco é um importante componente do arsenal terapêutico antimicrobiano. A recente reedição das normas para profilaxia da endocardite bacteriana é um exemplo claro deste fato. Apesar de existir concordância de que, para que seja efetivo, a amoxicilina ou um outro antibiótico qualquer devam ultrapassar em níveis séricos a concentração inibitória mínima de um dado patógeno, não é no sangue que a maioria das infecções se encontra. Poucos são os dados a respeito da concentração tissular que a amoxicilina atinge, uma maior ênfase sempre é dada aos níveis séricos da droga. Este trabalho teve por objetivo estudar a concentração tecidual da amoxicilina. Para tanto, utilizou-se 60 ratos, nos quais foram implantadas, dorsal e subcutâneamente, quatro esponjas de PVC. Após decorridos 14 dias da implantação, os animais receberam uma suspensão de amoxicilina, por via intragástrica, na dose de 40mg/kg. Decorridos 15 min, 30 min, 1, 1½, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas após a administração, as amostras de sangue, bem como os tecidos granulomatosos foram colhidos. As amostras de sangue foram centrifugadas e 10 µL dos soros obtidos foram distribuídos em discos de papel e, assim como os tecidos, foram dispostos em placas de Petri, contendo ágar Mueller Hinton previamente inoculado com  $10^8$  u.f.c./mL de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Após um período de incubação de 18 horas, os halos de inibição foram medidos e anotados para posterior análise. Previamente, foi construída uma curva de regressão, com o halo de inibição em função dos logaritmos de concentrações conhecidas da droga. Observou-se que o fármaco atingiu níveis acima das concentrações inibitória e bactericida mínimas, no período compreendido entre 30 min e 8 horas após a administração, tanto no sangue quanto no tecido. Os resultados levam a crer

---

que esquemas posológicos de 6/6 horas ou 8/8 horas são válidos para manter as concentrações antimicrobianas em níveis suficientes.

*PALAVRAS-CHAVE:* antibióticos beta-lactâmicos, biodisponibilidade de medicamentos, microbiologia farmacêutica, testes de sensibilidade microbiana.

### 3. INTRODUÇÃO

As penicilinas são, sem dúvida, o grupo de antimicrobianos mais empregados na história da Medicina. As razões principais são o grau de segurança e eficácia que têm demonstrado (AMATO-NETO et al., 1985).

Apesar da grande utilização e do longo período desde a sua descoberta e produção de novos beta-lactâmicos, o conhecimento a respeito destas drogas ainda não esclareceu alguns aspectos da sua farmacocinética.

A amoxicilina, dentre os beta-lactâmicos, tem um papel muito importante devido ao seu espectro de ação, sua excelente absorção por via oral, sua baixa taxa de efeitos colaterais e boa penetração tecidual (AMATO-NETO et al., 1985; FONSECA, 1988).

Dentre as metodologias disponíveis para a sua dosagem, destacam-se a cromatografia líquida de alta performance, métodos físico-químicos (iodometria, mercurimetria), espectrofotometria em ultravioleta e o método microbiológico (KOROLKOVAS, 1988). Para estes métodos citados, no entanto, existe normalmente a necessidade de homogeneização tecidual, o que poderia resultar na quebra da ligação entre os antimicrobianos e proteínas. Este fato poderia conduzir a resultados muitas vezes errôneos pois, porções da droga que normalmente não atuariam por estarem ligadas, tornam-se ativas e, portanto, disponíveis para dosagem (DAVEY, 1990).

Resolvemos estudar a concentração tecidual, ocasionada por uma dose única de amoxicilina em diferentes períodos de tempo, através de um método microbiológico e amostras delimitadas de tecido de origem e morfologia conhecidas retiradas de animais.

---

## 4. REVISÃO DA LITERATURA

### 1 - INFLAMAÇÃO CRÔNICA COMO MODELO DE ESTUDO

Os modelos experimentais que utilizam a reação a algum corpo estranho, usualmente implantado via subcutânea, e estudam o impacto de fármacos sobre ele, são chamados de modelos *ex vivo*. A implantação de corpos estranhos resulta na encapsulação dos mesmos por tecido granulomatoso ou fibrinoso. Este tipo de material permite a difusão de antimicrobianos e a entrada de fagócitos e anticorpos, ocasionando uma oportunidade para se examinar a efetividade de antimicrobianos conjuntamente com as células e fluidos biológicos do hospedeiro. Estes modelos podem ser válidos para determinação da capacidade de um antimicrobiano em penetrar em locais específicos de infecção, seu nível bactericida, seu efeito na fisiologia e morfologia da bactéria e a possibilidade da ocorrência de seleção ou resistência bacteriana (ZAK & O'REILLY, 1991).

A introdução de materiais estranhos no organismo animal, inertes e esterilizados, tem sido prática comum para permitir estudos onde o grau de fibrosamento e encapsulamento da lesão sejam importantes (GEVARTOSKY, 1984).

Dentre os vários métodos utilizados para indução desta injúria, a implantação de esponjas de policlorovinil (PVC), como agente desencadeador, no dorso de animais, tem sido um dos métodos mais utilizados (GRINDLAY & WAUGH, 1951; HICKS, 1969; VIZIOLI, 1973; ANDRADE, 1980; GEVARTOSKY, 1984; BARROS, 1989; MATTOS-FILHO, 1990; GROppo, 1996). Esse tecido tem morfologia e seqüência de formação bem estudadas. Os fenômenos morfológicos envolvidos com seu desenvolvimento são os seguintes (ANDRADE, 1980; GEVARTOSKY, 1984; MATTOS-FILHO, 1990):

- 1) Após 7 dias do implante observa-se uma cápsula fibrosa envolvente, já delimitada. Uma incipiente proliferação de tecido de granulação é notada, caracterizada pela presença de fibroblastos, células mesenquimais e neoformação de capilares.
- 2) Dentro de 14 dias após o implante nota-se um nítido avanço do fibrosamento, porém ainda existe formação de capilares e apesar da redução do número de células, estas parecem ocupar os espaços mais interiores da esponja.
- 3) Após 3 semanas de evolução (21 dias), a diferença para com o período anterior constitui-se apenas na quantidade aumentada de fibras colágenas e presença ocasional de algumas células gigantes de corpo estranho e macrófagos.
- 4) Em 28 dias após o implante observa-se um total envolvimento por fibras colágenas, delimitando o tecido externamente e invadindo o seu interior. Existe escassez de células e de vasos sanguíneos. Os autores são concordantes ao afirmar que, neste momento, a lesão atinge o seu ápice.

## 2 - A DINÂMICA DA INFECÇÃO

Existem evidências substanciais de que muitas infecções resultam de organismos que aderem às superfícies. A maior parte das bactérias não produz efeitos patogênicos em fluidos corpóreos, são encontradas em fluidos como resultado da difusão a partir do local de infecção, da contaminação provinda de instrumentação ou da ruptura do tecido. A primeira linha de defesa do organismo contra a invasão bacteriana é a fagocitose por células polimorfonucleares que requerem uma superfície para exercer sua atividade (LORIAN, 1989), portanto situa-se no tecido o local da verdadeira batalha contra os agentes patogênicos.



Para o sucesso da terapia com base em antimicrobianos, alguns aspectos devem ser observados tais como o conhecimento da sensibilidade do agente etiológico; as suas propriedades farmacológicas; a sensibilidade do microrganismo isolado em relação a outras cepas da mesma espécie, etc. (AMATO-NETO et al.,1985).

### 3 - COMO MEDIR A SENSIBILIDADE

Fleming, em 1924, foi o primeiro a realizar um teste de sensibilidade antimicrobiana (para o *Staphylococcus aureus* e penicilina), embora a ação de um organismo inibindo o crescimento de outro fosse primeiramente observada por Van Leeuwenhoek, em 1676 (BALOWS, 1974).

Muitos procedimentos, baseados na possibilidade de um agente antimicrobiano difundir-se por meio do ágar e inibir o crescimento de uma bactéria, foram descritos. Discos de papel, de 6,5 mm de diâmetro, como os usados hoje, foram descritos primeiramente por BONDI et al., em 1947.

Em 1966, BAUER et al. descreveram procedimentos padronizados para realizar o teste de sensibilidade em discos e comparar os diâmetros dos halos com a concentração inibitória mínima.

Enquanto desenvolviam-se os testes de sensibilidade, técnicas para determinar a concentração inibitória mínima de um agente antimicrobiano, foram também desenvolvidas. As técnicas hoje, utilizam diluições do antimicrobiano, em meio líquido ou sólido, no qual os organismos crescem. Um volume equivalente de organismos de teste é adicionado a um conjunto de tubos ou placas, que cobrem uma faixa de concentrações do antimicrobiano e, após incubação, a CIM é descrita como sendo o primeiro tubo ou placa no qual não há crescimento visível (PIDDOCK, 1990; KONEMAN et al., 1994).

Para determinar a atividade de um agente antimicrobiano podem ser feitos testes de difusão em meios de cultura. O antimicrobiano é aplicado à placa de Petri contendo o meio semeado, através de discos de papel, preparados e secos, contendo uma quantidade precisa da droga ou pela adição de uma solução de antimicrobiano a um poço cortado no meio de cultura. Cilindros de metal ou vidro, aplicados sobre a superfície do meio, são raramente usados nos dias atuais (PIDDOCK, 1990).

O antimicrobiano difunde-se de forma centrífuga, causando um gradiente, no qual observa-se uma menor concentração à medida que se afasta do centro, onde está posicionado o disco, até ser insuficiente para inibir o crescimento. Este gradiente é afetado pela capacidade da droga se difundir no ágar e pela taxa de crescimento da bactéria, sendo que no limite do halo de inibição formado encontra-se uma população crítica de células bacterianas. Usualmente, grandes halos de inibição formam-se quando a bactéria cresce lentamente e pequenos halos, quando cresce rapidamente (PIDDOCK, 1990; KONEMAN et al., 1994).

Devido à natureza do teste de difusão, são vários os fatores que o afetam. Tanto a concentração da droga no disco como o tamanho do inóculo, influenciarão na área final do halo de inibição. Na prática o inóculo deve ser preparado de uma cultura em caldo, que tenha sido incubada por 4 a 6 horas, quando o crescimento é considerado como sendo de fase exponencial (PIDDOCK, 1990).

Para o teste de Bauer-Kirby a densidade da suspensão é ajustada para cerca de  $10^8$  u.f.c./mL por comparação com padrão 0,5 de McFarland (KONEMAN et al., 1994).

Os halos de inibição são medidos em milímetros (mm), em testes onde a profundidade ótima do ágar é de cerca de 4mm (BARRY & FAY, 1973).

Para a maioria dos testes de sensibilidade tem-se usado o ágar Mueller Hinton ou outro especialmente formulado, que pode ser suplementado, quando necessário, com sangue ou produtos do sangue, os

quais não têm efeito na atividade da maioria dos agentes antimicrobianos (BRENNER & SHERRIS, 1972).

Todos os testes são afetados pela composição do meio de cultura, pH, temperatura e duração da incubação. A temperatura de incubação para a maioria dos testes é 35-37°C por 18 h, propiciando um crescimento ótimo para a maior parte dos patógenos humanos (PIDDOCK, 1990).

#### 4 - O USO CORRETO DE ANTIMICROBIANOS

A eficácia clínica de um antimicrobiano deve-se à eliminação total da infecção pelos processos de defesa do hospedeiro e não pela sua ação exclusiva. Os agentes bactericidas normalmente não necessitam de manutenção constante nos níveis sanguíneos, sendo que a concentração bactericida mínima causa a lise em bactérias sensíveis. Por isso, a dose adequada pode ser dividida em intervalos regulares apenas durante o dia (KARLOWSKY et al., 1993).

Os agentes bacteriostáticos, de uma forma geral, levam mais tempo para serem eficazes e dependem da manutenção constante nos níveis sanguíneos, acima das concentrações inibitórias mínimas. A dose apropriada deve ser dividida em doses regulares durante as 24 horas do dia e, caso a administração seja interrompida, a concentração sanguínea decrescerá possibilitando a sobrevivência e multiplicação dos microrganismos, causando a recorrência da infecção e o aparecimento de cepas resistentes à droga. Isto ocorre, principalmente, quando a duração do tratamento é inadequada ou quando são obtidas concentrações sub-inibitórias (LEWIS et al., 1986; KARLOWSKY et al., 1993).

Acredita-se que, em se aumentando as concentrações de um antimicrobiano acima da CIM, o resultado será um aumento concomitante da

taxa bactericida. Porém, numerosos investigadores têm demonstrado que a taxa de mortalidade bacteriana frente a antimicrobianos beta-lactâmicos é saturável com respeito à concentração; e a taxa de mortalidade máxima, *in vitro*, é 4 a 8 vezes maior que concentração bactericida mínima (GARRET, 1978; VOGELMAIN & CRAIG, 1986; BRICELAND et al., 1987; NAVASHIN et al., 1989). Altas concentrações não aumentam a taxa de mortalidade e podem ser prejudiciais.

### 5 - *Staphylococcus aureus*

É o mais importante agente causador de patologias infecciosas em humanos dentre os estafilococos. Entretanto, este microrganismo faz parte da microbiota normal humana, podendo causar infecções oportunistas significantes sob condições apropriadas (CARNEY et al., 1985; WALDVOGEL, 1990). Frequentemente é isolado de infecções em feridas pós-cirúrgicas, as quais podem servir como nicho, possibilitando o desenvolvimento de infecções sistêmicas (KONEMAN et al., 1994).

Para a amoxicilina a concentração inibitória mínima capaz de inibir o desenvolvimento de cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis, foi determinada por valores de 0,06 µg/mL (PHILIPS et al., 1991), 0,1 µg/mL (GROPPO, 1996) e 0,25 a 1 µg/mL (KONEMAN et al., 1994).

Atualmente, essas bactérias adquiriram importância ainda maior a partir da observação de que a incidência de endocardite estafilocócica tem aumentado drasticamente. Cepas de *Staphylococcus aureus*, sensíveis aos beta-lactâmicos, são os agentes etiológicos responsáveis pela moléstia em mais de 70% da doença diagnosticada em pacientes que fazem uso de drogas por via endovenosa. Outra razão é o fato de que os estafilococos são patógenos importantes para as infecções hospitalares (MCCARTNEY, 1992).

Este tipo de infecção causa significativa mortalidade e morbidade nos pacientes. As 2,5 milhões de infecções que ocorrem cada ano custam ao sistema de saúde americano de 5 a 10 milhões de dólares. O *Staphylococcus aureus* vem sendo reconhecido como importante patógeno e é o causador mais comum destas infecções. Cerca de 30% de todas as infecções causadas pelo *S. aureus* são devidas à microbiota endógena (PERL & GOLUB, 1998).

ROMAN et al. (1997) relataram que em maio de 1993 ocorreu um surto de *Staphylococcus aureus* metilina-resistentes (MRSA) no seu centro de atendimento. A cepa difundiu-se pelo ambiente hospitalar e investigações posteriores indicaram que ela tinha sido introduzida no oeste do Canadá por um paciente que estivera recentemente hospitalizado por 3 meses na Índia e fora admitido num hospital rural da Columbia Britânica (USA). A passagem do paciente para um hospital em Vancouver e subsequente transferência para outro em Manitoba, resultou na maior erupção de *S. aureus* MRSA na história dos dois hospitais, após apenas 6 semanas da chegada do paciente ao Canadá. A tipagem genética da cepa mostrou, mais uma vez, a propensão de certas cepas de *S. aureus* em produzir doenças epidêmicas, uma rápida difusão dentro das instituições de saúde e o problema de natureza global que é a resistência aos antimicrobianos.

KAMIYA (1997) argumenta que o uso de drogas antimicrobianas no Japão é extremamente alto. Só em 1994 o custo total da produção delas ficou em 3,38 bilhões de dólares. O uso intensivo de drogas de amplo-espectro, especialmente no tratamento de um crescente número de pacientes idosos e imunocomprometidos, resultou numa emergencial e expansiva resistência nos microrganismos. Um dos principais patógenos identificados dentro desta característica vem sendo as cepas de *Staphylococcus aureus* metilina-resistentes.

FARIAS et al. (1997) avaliaram o padrão de sensibilidade de cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina-susceptíveis e oxacilina-resistentes a agentes antimicrobianos comumente utilizados em infecções causadas por estes patógenos. As cepas (117) foram isoladas de vários hospitais em São

Paulo, Campinas e João Pessoa. Obtiveram a concentração inibitória mínima para 24 agentes antimicrobianos, incluindo beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, macrolídeos, etc. Os resultados mostraram uma alta e preocupante taxa de resistência entre as cepas de *S. aureus* obtidos nos hospitais brasileiros. Poucas drogas podem ainda ser efetivas contra doenças infecciosas provocadas por este microrganismo.

Desta forma, os estudos que visam o tratamento de doenças infecciosas provocadas por estafilococos, particularmente *Staphylococcus aureus*, sensíveis ou não aos beta-lactâmicos, tendem a se tornar cada vez mais importantes, porque as cepas resistentes são de difícil controle.

## **6 - AMOXICILINA (*alfa-amino-p-hidroxibenzilpenicilina*)**

A amoxicilina (derivado semi-sintético) é uma aminopenicilina formada pela adição de um grupo amino a estrutura básica da penicilina, muito semelhante à ampicilina, diferindo desta por conter uma hidroxila a mais em sua molécula (FONSECA, 1988; NATHWANI & WOOD, 1993). Estes análogos são essencialmente idênticos quanto a atividade *in vitro* e o espectro antibacteriano, entretanto a amoxicilina possui uma ação melhor sobre *Enterococcus faecalis* e *Salmonella* sp e menor sobre *Shigella* sp (NATHWANI & WOOD, 1993).

É considerado um antimicrobiano de espectro estendido, atuando inclusive contra bacilos gram-negativos (NATHWANI & WOOD, 1993).

Atua principalmente contra os seguintes microrganismos (FONSECA, 1988; KARLOWSKY et al., 1993):

- a) Microrganismos anaeróbios, aeróbios e facultativos gram-positivos (eficácia ligeiramente menor que a penicilina V);
- b) Cocos aeróbios gram-negativos (eficácia superior à penicilina V);

- c) Bacilos aeróbios gram-negativos (não atua contra *Proteus* indol-positivos, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia* e *Pseudomonas*).

Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da síntese da parede celular, de forma semelhante à penicilina G, diferindo pela maior capacidade de penetração nas barreiras lipídicas, principalmente em gram-negativos. Atua também na parede celular mais complexa, atingindo enzimas localizadas na face externa da membrana celular bacteriana (MONTGOMERY, 1991b).

Após doses orais equivalentes a amoxicilina produz concentrações séricas maiores que a ampícilina, porém são igualmente sensíveis à penicilinase (CROYDON & SUTHERLAND, 1971; NEU & WINSHELL, 1971a; NEU & WINSHELL, 1971b; SUTHERLAND & ROLISON, 1971).

As doses habitualmente empregadas do fármaco são da ordem de 250 a 500 mg, de 8/8 horas ou ainda 6/6 horas, perfazendo um total de 750 mg a 2g/dia. Em crianças é utilizada na dose de 25 a 50 mg/kg/dia (AMATONETO et al., 1985).

É eficaz como antimicrobiano de primeira escolha em regimes de profilaxia contra endocardite bacteriana, para procedimentos dentais, bucais ou do trato respiratório superior, em pacientes que apresentam riscos para aquela patologia. Neste caso, o regime padrão adotado para adultos é composto por uma dose de 2g do fármaco, por via oral, 1 hora antes do procedimento. Esta conduta é recomendada pela *American Heart Association* (DAJANI et al., 1997).

A amoxicilina também tem sido recomendada para o tratamento das infecções bucais, pois demonstrou ser efetiva sobre a vasta maioria dos microrganismos isolados de abscessos dento-alveolares agudos (GREENBERG, 1979) e por promover concentrações teciduais satisfatórias nas infecções agudas (BOON et al., 1982; AKIMOTO et al., 1994).

A amoxicilina é usada por via oral, na forma de triidrato, sendo 90% da dose administrada absorvida, em média. Quando absorvida, não

sofre modificações moleculares provocadas pelo organismo e provê concentrações séricas, com ligação plasmática de cerca de 17 a 20% (NEU, 1982; AMATO-NETO et al., 1985; FONSECA, 1988; HARDMAN & LIMBIRD, 1996).

NEU & WINSHELL (1971b) reportaram um pico médio no soro de 7,6µg/mL após administração oral de 500mg de amoxicilina para voluntários, e 3,8µg/mL para ampicilina. Picos consideravelmente maiores, 10,8 µg/mL para a amoxicilina e 6,3µg/mL para ampicilina, foram encontrados com as mesmas doses, em outro estudo (CROYDON & SUTHERLAND, 1971).

DAJANI et al. (1994) observaram a farmacocinética da amoxicilina administrada em seres humanos. Após uma única dose de 2 ou 3 g, que significaram em função dos pesos dos voluntários de 20 a 60 mg/kg, os autores mediram as concentrações plasmáticas após 1, 2, 4 e 6 horas. Encontraram para a dose relativa de 40 mg/kg, respectivamente 9,0; 14,5; 10,7 e 3,7µg/mL. A metodologia empregada preconizava o uso de um cromatógrafo líquido de alta performance. Os autores argumentam que as doses utilizadas ultrapassaram a concentração inibitória mínima para os estreptococos orais, durante todos os períodos estudados.

AKIMOTO et al. em 1982, utilizando uma dose de 500mg de amoxicilina, relataram que o fármaco penetrou melhor na maxila (1,84 µg/g) que na mandíbula (0,95 µg/g), porém as concentrações obtidas em ambos locais eram menores que no soro (5,99 µg/mL). Entretanto, em pus de abscessos causados por infecções odontogênicas, sua concentração (0,90 µg/mL após 1,5h) excedia o MIC90% para estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos (AKIMOTO et al., 1994).

Existem várias metodologias utilizadas para a determinação da concentração de amoxicilina, as quais dependem basicamente do grau de precisão necessário, do tipo de meio onde o antimicrobiano está presente (cápsulas, tecido, sangue etc.) e da disponibilidade de equipamento para a dosagem (HSU & HSU, 1992).



Dentre os métodos empregados para tal fim, podem ser citados a titulação com nitrato de mercúrio (BRITISH PHARMACOPEIA, 1988), método microbiológico, ensaio iodométrico e método óptico (US PHARMACOPEIA, 1990) e espectrofotométrico (DEVANI et al., 1992). Para a determinação em fluidos biológicos, vários autores tem utilizado a cromatografia líquida de alta performance (HSU & HSU, 1992; KRAUWINKEL et al., 1993; CHARLES & CHULAVATNATOL, 1993; MOORE et al., 1996).

Os relatos de comparação entre os métodos, principalmente entre o cromatográfico de alta performance com o microbiológico, apontam para a igualdade de resultados obtidos (HSU & HSU, 1992; MOORE et al., 1996).

A presença de alimentos no trato gastrointestinal não afeta as concentrações plasmáticas da amoxicilina (DAJANI et al., 1994).

Distribui-se bem por todo o organismo, tendo inclusive demonstrado boa penetração através da barreira hemoliquórica e boa transferência materno-fetal, atingindo no sangue fetal níveis dentro dos limites terapêuticos (AMATO NETO, 1985).

A excreção é feita pela urina em sua forma ativa, sendo que a amoxicilina tem maior taxa de excreção do que a ampicilina (CROYDON & SUTHERLAND, 1971; NEU & WINSHELL, 1971b).

Quanto a seus efeitos colaterais, pode-se dizer que é melhor tolerada, quando em uso oral, do que seus similares, provocando menos náuseas, vômitos e diarreia (FONSECA, 1988).

## **7 - FARMACOCINÉTICA DOS ANTIMICROBIANOS**

A maioria das drogas difundem-se livremente no fluido intersticial, dentro dos tecidos, devido às "fenestrações" das paredes capilares. Poucos tecidos são exceções a esta regra, tais como o cérebro, fluido cérebro-espinhal, glândula prostática e humor aquoso (DAVEY, 1990).

Para a maioria das situações clínicas pode-se assumir que os fármacos passam livremente do sangue para o fluido intersticial por meio dos tecidos. Entretanto, a farmacocinética dos antimicrobianos dentro do fluido intersticial e no sangue é completamente diferente. A concentração tecidual normalmente eleva e diminui mais lentamente nas primeiras horas após a administração. As concentrações séricas são mais altas do que os níveis do fluido intersticial, mas eventualmente, com o tempo, o oposto começa a ser verdadeiro (DAVEY, 1990).

Existem muitos fatores farmacocinéticos que influenciam o resultado clínico final, como a concentração máxima de antimicrobiano no local da infecção ( $C_{m\acute{a}x}$ ), o tempo de meia vida ( $T_{1/2}$ ) e a quantidade total do antimicrobiano presente durante o período entre doses (área sob a curva, ASC). No sangue existem proteínas plasmáticas que se ligam aos antimicrobianos e, conseqüentemente, apenas a fração livre do mesmo é farmacologicamente ativa. Considera-se que, se menos de 70% do antimicrobiano estiver ligado a proteínas, então esta ligação não será clinicamente importante (PIDDOCK, 1990).

A relação entre os parâmetros farmacocinéticos e a CIM é ainda desconhecida, embora os parâmetros possam ser diferentes nas diversas categorias de pacientes. Tem sido sugerido que a  $C_{m\acute{a}x}$  deve ser ao menos igual à CIM (PIDDOCK, 1990).

Clinicamente, poder-se-ia considerar que um microrganismo é suscetível ou sensível quando morre ou tem seu crescimento inibido, *in vitro*, por determinada concentração do antimicrobiano facilmente atingida, *in vivo*, no local onde se encontra o agente infeccioso - ou via de regra - no sangue do paciente. É considerado resistente o microrganismo que tolera a concentração sérica máxima atingida por doses terapêuticas (AMATO-NETO et al., 1985).

O período de tempo durante o qual o antimicrobiano estará presente em concentrações eficazes, no local da infecção, dependerá da velocidade de inativação da droga por meio do metabolismo, excreção ou

ambos. Baseando-se na velocidade normal de biotransformação e excreção a dose será repetida a intervalos específicos, de forma que sejam mantidas as concentrações séricas antibacterianas (MONTGOMERY, 1991a).

A via de administração e a posologia são importantes fatores na determinação da concentração final no local da infecção. Infecções em áreas com suprimento sanguíneo relativamente deficiente, como em abscessos, áreas necróticas e infecções otológicas, bem como em áreas ósseas, são de difícil tratamento antimicrobiano. Os abscessos podem representar problema ainda maior, pois a infecção está contida pelos mecanismos de defesa do organismo e as bactérias multiplicam-se em velocidade extremamente lenta (MONTGOMERY, 1991a).

Os fatores que influenciam as concentrações séricas de antimicrobianos são os mesmos que influenciam aos outros fármacos, ou sejam: doses utilizadas, intervalos entre doses, absorção, metabolismo e excreção, entre outros. Uma bactéria isolada de material colhido de um abscesso, por exemplo, que se mostra sensível a determinado antimicrobiano, *in vitro*, pode não responder ao tratamento pelo fato deste não ter acesso à intimidade do abscesso, onde se encontra o agente agressor. Assim, a interação entre antimicrobiano e agente agressor, é sempre muito mais complexa *in vivo* (AMATO-NETO et al., 1985).

## 8 - MEDIÇÃO DE NÍVEIS TECIDUAIS DE DROGAS

As concentrações teciduais são usualmente medidas por homogeneização do tecido, o qual consiste de cerca de 80% de células e 20% de fluido. Desta forma, caso a droga concentre-se dentro das células a medida refletirá a concentração citoplasmática, mas não necessariamente aquela do fluido intersticial. Para penicilinas ou cefalosporinas, as concentrações em homogenatos teciduais subestimam concentrações no

fluido intersticial em cerca de 25%. Isto é devido, em grande parte, ao fato de que o volume de homogenato é mascarado por células (DAVEY, 1990).

FISHMAN & HEWITT (1970) sugerem que a penetração de agentes quimioterápicos nos locais infeccionados, principalmente nas áreas avasculares, abscessos ou matrizes de fibrina, pode ser reduzida e seria um determinante crítico no resultado do tratamento.

Apesar das concentrações séricas de antimicrobianos serem comumente equiparadas com efetividade terapêutica em infecções em locais vascularizados (EAGLE et al., 1953; GIBALDI & SCHWARTZ, 1968), é antigo o conceito de que, em processos infecciosos, ricos em fibrina e avasculares, o nível de droga não refletirá aquele do soro (BARZA & WEINSTEIN, 1974).

ROBSON et al. (1974) argumentam que a base de fibrina, quando presente no tecido granulomatoso, parece evitar a difusão do antimicrobiano para dentro dele. Conclusão semelhante encontramos em GEVARTOSKY (1984) quando estudou histologicamente três antimicrobianos sobre a evolução do tecido granulomatoso em ratos, por meio do implante de esponja de PVC.

Para estudar a farmacocinética da ampicilina e amoxicilina, GORDON et al. (1972) administraram, por via oral, doses de 500mg, a 8 voluntários, em jejum. Após a colheita de amostras de sangue e de urina, estas foram submetidas ao método de difusão em ágar. Verificaram que a absorção da amoxicilina foi significativamente melhor, mostrando uma maior concentração média no pico plasmático (7,6 µg/mL). As meias-vidas plasmáticas foram as mesmas para os dois antimicrobianos, com valores próximos a 60min. A amoxicilina proporcionou concentrações mensuráveis no sangue, durante 8 horas em todos os voluntários.

PIEPER et al. (1985) conduziram estudo onde observaram a penetração de antimicrobianos em válvulas cardíacas e aurículas, utilizando método microbiológico. Os diâmetros de halo de inibição assim obtidos, foram comparados contra uma curva de regressão (log da concentração x

---

diâmetro do halo de inibição) convertendo os valores encontrados em miligramas de antimicrobiano.

MATTOS-FILHO et al. (1994) observaram, qualitativamente, a penetração tecidual da penicilina G, em camundongos, utilizando tecido granulomatoso obtido pela prévia implantação de esponjas de PVC nos animais. Os autores relatam níveis suficientes do antimicrobiano para inibir o crescimento de *Streptococcus* sp e de *Staphylococcus* sp.

GROPPO (1996) estudou a influência da evolução do tecido granulomatoso sobre a difusibilidade de diferentes doses de amoxicilina em ratos. Empregou doses de 3, 7, 40 e 80 mg/kg, em períodos de evolução de 7, 14, 21 e 28 dias. O autor não observou diferenças entre os resultados obtidos nos diferentes períodos de tempo, considerando-se uma mesma dose. Para o período de 14 dias e dose única de amoxicilina a 40mg/kg, observou valores de 25,2 mm de halo de inibição, que significou 103 µg/mL para a concentração sanguínea e 26,02 mm de halo de inibição, significando 57,87 µg/mg para a concentração tecidual, após decorrido 1 hora da administração por via oral.

---

## 5. PROPOSIÇÃO

Com o objetivo de estudar a farmacocinética da amoxicilina, resolvemos:

1. Testar a difusibilidade da amoxicilina *in vitro*, utilizando tecido granulomatoso induzido em ratos, nos períodos de 15 e 30 minutos, 1, 1 ½, 2, 4, 6, 8, 10, 12 horas após administração oral.
2. Estabelecer correlação entre o nível de atividade antibiótica tecidual e a concentração sérica, nos referidos períodos.
3. Observar a relação entre as concentrações de antimicrobiano (séricas ou teciduais) e as concentrações inibitória e bactericida mínimas para a cepa em estudo, nos vários períodos de tempo após a administração.

---

## 6. MATERIAL E MÉTODO

### MATERIAL

#### 6.1 - ANIMAIS

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus - albinus*, Wistar), adultos jovens (60 dias), machos, pesando entre 150 e 200 g, S.P.F.\*\*\*\*<sup>1</sup>, que foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP.

Após a chegada dos animais à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, os animais permaneceram cerca de uma semana nas dependências do biotério de experimentação da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica e receberam, nesta fase de adaptação e também durante a fase experimental, ração balanceada comercial<sup>2</sup> e água *ad libitum*.

#### 6.2 - MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi o *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923. Esta cepa foi reativada segundo instruções do doador<sup>3</sup> (Anexo 1), constatando-se, após cultivo em ágar triptona soja<sup>4</sup> (TSA), a viabilidade da mesma (KONEMAN et al., 1994) e análise da pureza pelo método de Gram. Todos os procedimentos, envolvendo amostras bacterianas foram realizados em câmara de segurança classe II.

---

<sup>1</sup> Specific pathogen free - livre de 4 tipos de patógenos.

<sup>2</sup> Purina.

<sup>3</sup> Doador pela Fundação André Tosello.

<sup>4</sup> Oxoid.

### 6.3 - DISCOS

Obteve-se, por meio da utilização de um perfurador, discos de esponjas de policlorovinil<sup>5</sup> (PVC), com 1 mm de altura e 6,2 mm de diâmetro. Estes foram esterilizados em autoclave, a 120°C por 15 min, previamente ao implante.

Discos de papel de filtro ("blank") comerciais<sup>6</sup>, no diâmetro de 6,25 mm, foram esterilizados em autoclave, a 120°C por 15 min.

### 6.4 - MEIOS DE CULTURA

Para a manutenção da cepa esta foi inoculada a cada 7 dias em tubos de cultura esterilizados, contendo TSA inclinado. Vinte e quatro horas antes do teste, eram novamente inoculadas em TSA. No dia da retirada das amostras, 4-5 horas antes, o microrganismo foi inoculado em infuso de cérebro-coração<sup>7</sup> (BHI) e incubado a 37°C em estufa de incubação (KONEMAN et al., 1994).

Para a determinação da concentração inibitória mínima utilizou-se o caldo Mueller Hinton<sup>8</sup> (MHB) e para concentração bactericida mínima utilizou-se o ágar Mueller Hinton<sup>9</sup> (MHA).

Para a realização do teste de sensibilidade utilizou-se o MHA, com pH ajustado, em pHmetro, a 6,8, por meio de adição de ácido clorídrico 0,1 N. Este meio foi distribuído (22mL) em placas de Petri, de 150 x 20mm, previamente esterilizadas.

---

<sup>5</sup> Provenientes do interior de embalagens de caixas de lamínulas da marca Perfecta.

<sup>6</sup> Cecon

<sup>7</sup> Difco

<sup>8</sup> Oxoid

<sup>9</sup> Oxoid.



## MÉTODO

### 6.5 - OBTENÇÃO DO TECIDO GRANULOMATOSO

O tecido granulomatoso foi obtido por meio do implante de 4 discos de esponja de PVC, esterilizados, no tecido subcutâneo no dorso dos animais, de acordo com a técnica descrita a seguir:

- 1 - Anestesia com éter etílico<sup>10</sup>, em campânula de vidro;
- 2 - Tricotomia da região dorsal mediana e anti-sepsia com solução de álcool iodado a 2%;
- 3 - Incisão de aproximadamente 1 cm, perpendicularmente à coluna vertebral (latero-lateral), na derme, sem invasão de tecido muscular, com tesoura de ponta reta fina;
- 4 - Divulsão do tecido subcutâneo com tesoura de ponta romba;
- 5 - Introdução das esponjas, o mais distante possível da incisão, em posições laterais, uma à esquerda e outra à direita, em direção à cabeça e uma à esquerda e outra à direita, em direção à cauda;
- 6 - Sutura com dois pontos simples, com fio de algodão número zero.

### 6.6 - ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS

A amoxicilina<sup>11</sup> foi administrada em dose única de 40 mg/Kg, por via intragástrica, com agulha curva<sup>12</sup>, 70 x 15, acoplada à seringa hipodérmica, 15 e 30 minutos, 1, 1½, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas antes da retirada dos tecidos granulomatosos. A agulha utilizada pode ser vista na Figura 1.

---

<sup>10</sup> Chemco.

<sup>11</sup> Sigma Co.

<sup>12</sup> Arkansas.



Figura 1. Agulha utilizada para introdução do fármaco por via intragástrica.

### 6.7 - OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE $10^8$ u.f.c./mL

Para este propósito, adotou-se as recomendações de GROPPA (1996):

- 1 - Colheu-se uma alçada de bactérias cultivada em TSA inclinado, com alça de platina esterilizada;
- 2 - Colocou-se a mesma em um tubo de ensaio, contendo 10 mL de BHI e incubou-se em estufa de cultura a  $37^{\circ}\text{C}$  por 4 a 5 horas, para atingir a fase exponencial da bactéria;
- 3 - Após o período de incubação, diluiu-se uma alíquota de 1 mL desta amostra em um tubo com solução salina de cloreto de sódio a 0,9% até obtenção de uma suspensão bacteriana com densidade óptica de 60% de transmitância, com o espectrofotômetro<sup>13</sup> previamente zerado com água destilada e deionizada, ajustado para 800 nm de comprimento de onda;
- 4 - Após este procedimento de padronização, transferiu-se 1mL do inóculo ajustado obtido para 99 mL de MHA, com temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$ . Após a homogeneização do ágar liquefeito inoculado, este foi dispensado em placas de Petri esterilizadas, de 150 x 20 mm (22 mL para cada placa);
- 5 - Após 15 minutos em repouso para a solidificação do ágar, à temperatura ambiente, colocou-se os materiais em teste.

---

<sup>13</sup> Bausch & Lomb – Spetronic 20

## 6.8 - OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO

Para que fosse possível a correlação entre os diâmetros dos halos produzidos pelas amostras e a provável concentração do antimicrobiano em estudo, construiu-se uma curva padrão. Esta técnica consistiu em posicionar discos de papel, esterilizados, embebidos com 10  $\mu\text{L}$  de concentrações variadas do antimicrobiano, em placas com MHA semeado com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As concentrações (em  $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ ) utilizadas foram de 0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0; 13,0 e 15,0.

Os discos foram colocados em estufa a 37°C por 1 hora para secagem. Foram então, distribuídos por meio de pinça clínica reta esterilizada, em placas contendo MHA inoculado como descrito no item 6.7. Foram dispostos quatro discos em cada placa e utilizou-se três placas para cada concentração, de tal forma que três valores de halo de inibição foram obtidos para cada concentração em estudo.

As placas, com os discos em posição, foram levadas à estufa a 37°C, por 18 horas. Após esse período, adicionou-se 3 mL de cloreto de trifeniltetrazólio<sup>14</sup> a 0,1% em ágar<sup>15</sup> a 1% em cada placa. Depois da solidificação do ágar, observou-se quais as placas que realmente apresentavam crescimento bacteriano, ou seja, aquelas que apresentavam coloração avermelhada produzida caracteristicamente pela formazana (produto da redução do cloreto de trifeniltetrazólio por cepas bacterianas em crescimento). Mediu-se os halos com paquímetro<sup>16</sup> e as médias destes três valores foram inseridas em um programa de computador<sup>17</sup>, que traçou a curva, forneceu o valor de R-quadrado ( $R^2$ ) e a equação (diâmetro de halo de inibição em função da concentração que o originou). Este programa permitiu ainda, a conversão dos valores dos halos observados com as amostras de sangue e tecido granulomatoso.

<sup>14</sup> Fluka Chemie

<sup>15</sup> Biobrás

<sup>16</sup> Starrett

<sup>17</sup> Excel for Windows, v. 7.0. Microsoft Co., licença n.o 0494-59200 BR

## 6.9 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Para determinar a CIM foram utilizados 40 tubos de cultura contendo MHB e concentrações crescentes de amoxicilina, dentro de limites terapêuticos lográveis, conforme a Tabela 1, mais os tubos "controle". A obtenção da CIM da amoxicilina seguiu a metodologia preconizada por KONEMAN et al. (1994).

O inóculo para este teste foi obtido como descrito no item 6.7, porém a concentração bacteriana final foi de  $10^6$  u.f.c./mL, como recomendado por PIDDOCK (1990).

Após os tubos estarem com suas devidas concentrações da droga, foram então inoculados e agitados e posteriormente incubados em estufa bacteriológica a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

Decorrido este período, os tubos foram analisados a olho nu e daqueles onde não havia crescimento, foram retiradas alíquotas que foram inoculadas em placas com MHA para a determinação da concentração bactericida mínima (item 6.10). Após este procedimento foi adicionado a todos os tubos solução de cloreto de trifeniltetrazólio a 0,1% em MHB 1% para evidenciar o crescimento bacteriano (ITO, 1995; GROppo, 1996). Após 1 hora da adição deste último, observou-se a coloração e a menor concentração, onde não aparecessem quaisquer evidências de desenvolvimento bacteriano, foi denominada de concentração inibitória mínima.

As quantidades utilizadas da droga foram calculadas de tal forma que as concentrações finais nos tubos, fossem (em  $\mu\text{g/mL}$ ) as mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentração de amoxicilina em µg/mL presente nos tubos para determinação da CIM.

1- 0,001	12- 0,13	23- 0,7	34- 2,7
2- 0,003	13- 0,15	24- 0,9	35- 2,9
3- 0,005	14- 0,17	25- 1,0	36- 3,0
4- 0,007	15- 0,19	26- 1,1	37- 5,0
5- 0,009	16- 0,21	27- 1,3	38- 7,0
6- 0,01	17- 0,23	28- 1,5	39- 9,0
7- 0,03	18- 0,25	29- 1,7	40- 10,0
8- 0,07	19- 0,27	30- 1,9	41- contr ester
9- 0,09	20- 0,29	31- 2,1	42- contr cresc
10- 0,10	21- 0,30	32- 2,3	
11- 0,11	22- 0,50	33- 2,5	

Legenda: contr ester – controle de esterilidade contr cresc – controle de crescimento

### 6.10 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Antes da adição do cloreto de trifeniltetrazólio, na leitura da CIM, dos tubos onde não havia evidências do crescimento bacteriano, foram retirados 10µL, os quais eram inoculados em placas previamente preparadas contendo MHA.

Estas placas foram incubadas a 37<sup>0</sup>C por 24 horas e após este período adicionou-se cloreto de trifeniltetrazólio em ágar, como na determinação da curva padrão, e a menor concentração onde não evidenciou-se qualquer crescimento bacteriano, foi denominada concentração bactericida mínima (CBM100%).

### 6.11 - OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE E DOS TECIDOS GRANULOMATOSOS

As amostras foram colhidas, decorrido quatorze (14) dias de evolução dos tecidos granulomatosos, em todos os períodos após a administração da droga.

Após anestesia com éter etílico, seccionou-se o plexo carotídeo dos animais, de onde foram colhidas amostras de 5mL de sangue em tubos de ensaio. Estas foram submetidas à retração do coágulo e dissoradas a 37°C, em banho-maria. Após este procedimento foram centrifugadas, durante 10min a 3.500 rpm, sendo então retiradas 2 amostras de 10µL do soro sangüíneo resultante. Cada uma delas foi colocada em um disco de papel de filtro esterilizado (disco "blank"). Após a secagem, em estufa a 37°C, por 1 hora, os dois discos foram posicionados em diferentes placas, previamente inoculadas como anteriormente descrito no item 6.7. Os halos de inibição formados após 18 horas de incubação, em estufa a 37°C, foram medidos e seus valores anotados para análise.

Após a remoção do sangue, os tecidos granulomatosos foram cuidadosamente retirados, mediante técnica cirúrgica, onde procurou-se remover todo o tecido excedente que envolvia o mesmo. Dois destes tecidos foram dispostos também em placas de Petri previamente preparadas conforme item 6.7. As amostras oriundas de cada animal foram separadas em placas distintas, sendo que em cada placa havia quatro amostras de animais diferentes, dispostas cerca de 50 mm de distância uma da outra. Após 18 horas de incubação, os halos de inibição foram medidos com auxílio do paquímetro, levando-se em consideração o diâmetro total do halo de inibição, incluindo o tecido. As outras duas amostras foram colocadas em vidros de relógio e imediatamente pesadas (peso úmido), sendo armazenados em estufa a 105°C. Após intervalos de aproximadamente 6 horas, eram novamente pesadas e quando o peso mostrava-se estável, este foi então, denominado de peso seco.

---

Após a obtenção dos diâmetros dos halos de inibição (em milímetros), estes foram submetidos à curva padrão, sendo que os resultados, oriundos desta conversão, foram anotados e plotados graficamente.

### **6.12 - ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos com relação aos pesos (em mg) foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey-Kramer, com nível de significância de 5%, com auxílio de um programa de computador<sup>18</sup>.

---

<sup>18</sup> Jump for Windows, v. 3.1.5 - SAS Institute Inc., licença n.o 40-2301

---

## 7. RESULTADOS

Em todos os animais utilizados, onde se fez o implante de esponja de PVC, observou-se a formação de tecido granulomatoso.

O estudo da concentração inibitória mínima (CIM), sobre a cepa de *Staphylococcus aureus* utilizada, revelou ausência de crescimento bacteriano (ausência de coloração avermelhada) a partir do tubo com 0,1µg/mL de antimicrobiano. Assim, consideramos esta concentração como a CIM.

A partir do tubo que proporcionou a CIM, foram retiradas alíquotas e distribuídas em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton, para a obtenção da concentração bactericida mínima 100% (CBM<sub>100</sub>), isto é, a concentração que matou completamente todas as cepas bacterianas. A primeira concentração onde não apareceu crescimento bacteriano foi 1,9µg/mL.

Os resultados relativos ao peso úmido e seco dos tecidos granulomatosos encontram-se nos Anexos 2 e 3, respectivamente. A Tabela 2 mostra as médias, bem como o erro padrão da média (E.P.M.), para os valores encontrados, nos diferentes períodos de estudo.



Tabela 2 - Médias de peso úmido e seco, em gramas ( $\pm$  erro padrão da média) dos tecidos granulomatosos, para os diferentes períodos de estudo.

GRUPO	n	Peso Úmido (g) MÉDIA ( $\pm$ E.P.M.)	Peso seco (g) MÉDIA ( $\pm$ E.P.M.)
15 minutos	12	0,0206 (0,0008)	0,0044 (0,00013)
30 minutos	12	0,0181 (0,0010)	0,0045 (0,00032)
1 hora	12	0,0229 (0,0014)	0,0049 (0,00023)
1½ hora	12	0,0197 (0,0015)	0,0039 (0,00039)
2 horas	12	0,0218 (0,0014)	0,0043 (0,00026)
4 horas	12	0,0224 (0,0014)	0,0043 (0,00031)
6 horas	12	0,0197 (0,0013)	0,0046 (0,0003)
8 horas	12	0,0182 (0,0016)	0,0038 (0,00025)
10 horas	12	0,0194 (0,0016)	0,0046 (0,00031)
12 horas	12	0,0190 (0,0011)	0,0043 (0,00029)
Média	120	0,0202	0,00436

Para observar se haviam variações estatisticamente significantes quanto ao peso, foi feita a análise de variância e o teste de Tukey-Kramer, com nível de significância de 5%, para os valores obtidos de peso úmido e seco. A análise dos resultados evidenciou que não haviam diferenças entre os valores de peso úmido entre os grupos tratados, o mesmo fato ocorrendo com relação aos valores dos pesos secos.

A Tabela 3 mostra os diâmetros dos halos de inibição proporcionados por diferentes concentrações do antimicrobiano, presentes nos discos. As médias obtidas foram utilizadas para a obtenção da curva de regressão.

Tabela 3 - Diâmetros em mm dos halos de inibição correlacionados com as quantidades de amoxicilina em  $\mu\text{g}$  pelas quais foram obtidos.

QUANTIDADE DE AMOXICILINA	MEDIDA 1	MEDIDA 2	MEDIDA 3	MÉDIA
0,03	8,45	8,44	8,15	8,35
0,05	10,96	9,67	10,76	10,46
0,1	14,24	14,56	13,47	14,09
0,3	19,45	19,04	19,10	19,20
0,5	21,05	21,18	21,66	21,30
0,7	22,72	22,41	22,90	22,68
1	25,03	23,66	25,04	24,58
3	27,73	27,52	27,68	27,64
5	29,88	29,28	29,41	29,52
7	30,88	30,75	31,02	30,88
10	31,74	31,53	31,90	31,72
13	33,41	32,05	32,56	32,67
15	34,00	32,63	32,44	33,02

A curva de regressão (Figura 2), foi traçada através da plotagem das médias de diâmetros de halo de inibição (Tabela 3), contra o logaritmo das concentrações de amoxicilina, sendo sua equação matemática e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) estabelecidos.

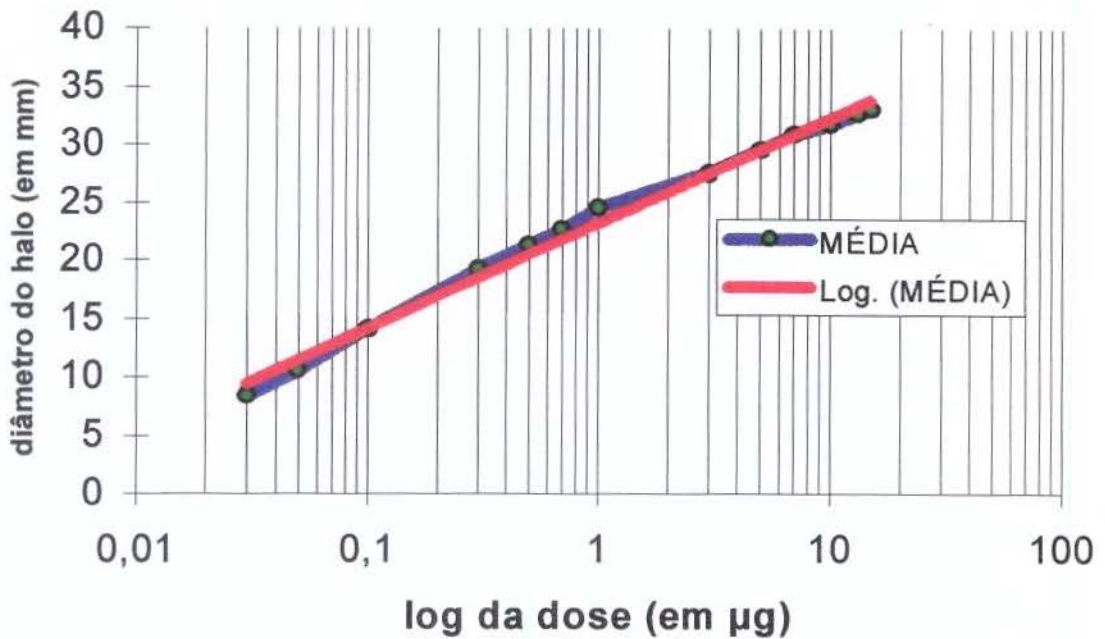


Figura 2 – Representação gráfica dos valores médios dos diâmetros dos halos de inibição, em função dos logaritmos das quantidades de antimicrobiano empregadas e a equação da regressão.

A equação obtida, a partir da curva, foi  $y = 3,9337 \ln(x) + 23,193$ , com  $R^2=0,9915$ , onde  $y$  = diâmetro do halo de inibição (mm) e  $x$ =quantidade de antimicrobiano ( $\mu\text{g}$ ), é válida para concentrações de amoxicilina entre  $0,03 \mu\text{g}$  (8,35 mm) e  $15 \mu\text{g}$  (33,02 mm). O  $R^2$  indica a correlação entre os valores de halo de inibição e a dose que os gerou. Quanto mais próximo a 1 maior é a correlação entre os dois valores.

Substituindo na equação, os valores de halo de inibição obtidos com as amostras de tecido granulomatoso e com as amostras sangüíneas, nos diversos períodos estudados, obtivemos a quantidade absoluta de antimicrobiano. Após correlacionarmos os valores teciduais com os respectivos pesos úmidos médios de cada grupo ou com  $10 \mu\text{L}$  de soro sangüíneo, obtivemos a concentração de antimicrobiano em 1 g de tecido ou 1 mL de soro, respectivamente.

A tabela 4 mostra as médias dos halos de inibição e a quantidade calculada em  $\mu\text{g/mL}$  ( $\pm\text{E.P.M.}$ ) para as amostras de sangue.

Tabela 4 – Valores médios dos halos de inibição e concentrações calculadas de amoxicilina, nos períodos para as amostras de sangue.

GRUPO	n	Média dos halos de inibição em mm ( $\pm$ E.P.M.)	Concentração calculada em $\mu$ g/mL
15min	12	0 (0)	<b>0</b>
30min	12	12,23 (0,31)	<b>6</b>
1 hora	12	17,34 (0,39)	<b>23</b>
1½ hora	12	18,19 (0,22)	<b>28</b>
2 horas	12	17,77 (0,38)	<b>26</b>
4 horas	12	9,62 (0,2)	<b>3</b>
6 horas	12	9,28 (0,2)	<b>3</b>
8 horas	12	8,71 (0,13)	<b>3</b>
10 horas	12	0 (0)	<b>0</b>
12 horas	12	0 (0)	<b>0</b>

Observa-se pelos dados da tabela acima que o pico de concentração sérica obtido foi de 28  $\mu$ g/mL, após 1 hora e 30 minutos da administração da amoxicilina.

A Figura 3 mostra os resultados obtidos para as amostras de sangue dos animais.

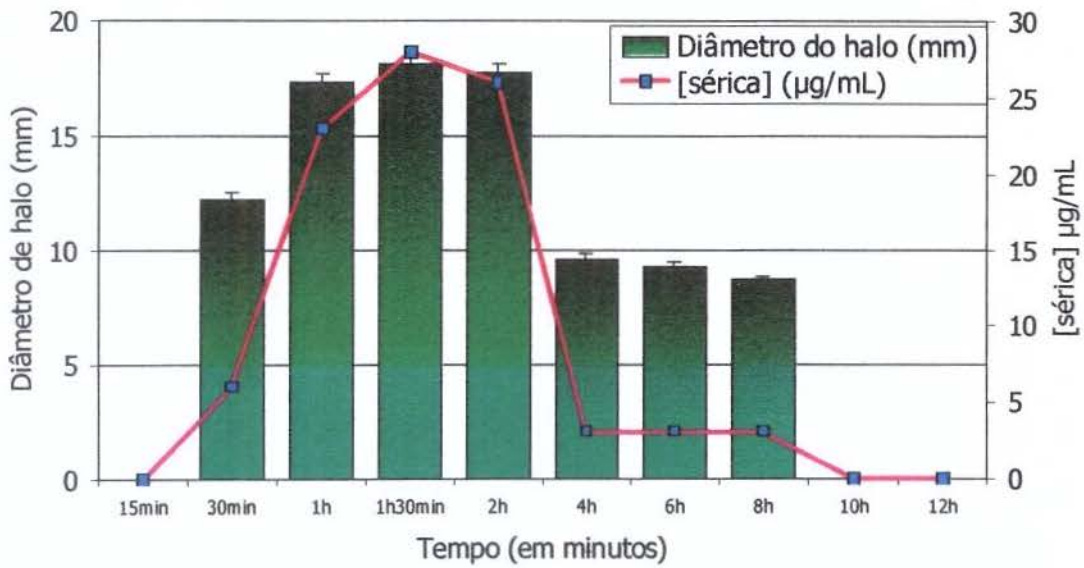


Figura 3 - Representação gráfica dos valores médios do diâmetro do halo de inibição e concentrações calculadas por meio da curva de calibração, nas diferentes dosagens, para as amostras de sangue dos animais.

Os valores médios dos halos de inibição proporcionados pelos tecidos granulomatosos, bem como as quantidades calculadas nos diferentes grupos de estudo, encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores médios dos halos de inibição e quantidades calculadas de amoxicilina, em  $\mu\text{g/g}$ , nos períodos para os tecidos granulomatosos.

GRUPO	n	Média dos halos de inibição em mm ( $\pm$ E.P.M.)	$\mu\text{g/g}$
15min	12	0 (0)	<b>0</b>
30min	12	17,8 (0,41)	<b>17,33</b>
1 hora	12	20,96 (0,42)	<b>38,0</b>
1½ hora	12	24,92 (0,39)	<b>103,33</b>
2 horas	12	26,76 (0,83)	<b>164,67</b>
4 horas	12	11,87 (0,37)	<b>4,0</b>
6 horas	12	10,07 (0,37)	<b>2,67</b>
8 horas	12	9,5 (0,33)	<b>2,0</b>
10 horas	12	0 (0)	<b>0</b>
12 horas	12	0 (0)	<b>0</b>

Para a concentração tecidual o pico obtido foi de 164,67  $\mu\text{g/g}$ , após 2 horas da administração da amoxicilina.

Os valores obtidos para todas as amostras de sangue e tecidos granulomatosos são encontrados respectivamente nos Anexos 4 e 5.

A Figura 4 mostra os resultados obtidos para as amostras de tecido granulomatoso dos animais.

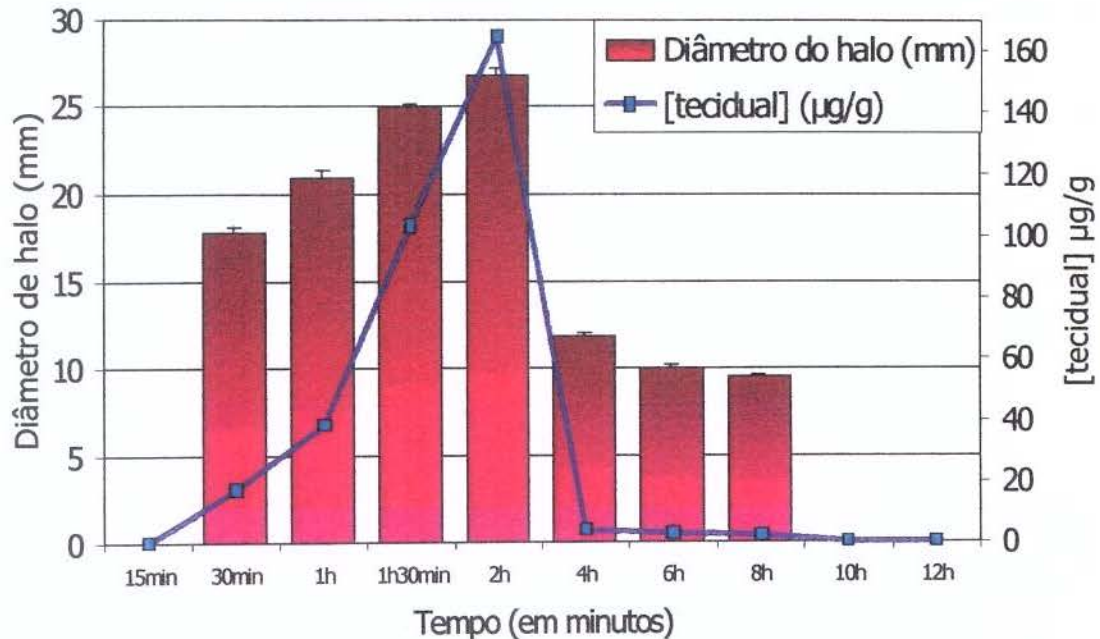


Figura 4 - Representação gráfica dos valores médios do diâmetro do halo de inibição e concentrações calculadas por meio da curva de calibração, nas diferentes dosagens, para as amostras de tecido granulomatoso dos animais.

A Figura 5 mostra a correlação entre a concentração tecidual (em µg/g, escala de 0 a 180) e sérica (em µg/mL, escala de 0 a 30) no decorrer dos períodos e também de sua relação com as concentrações inibitória mínima e bactericida mínima. Para uma melhor observação dos períodos de 8, 10 e 12 horas, uma escala mais detalhada da Figura 5, pode ser observada na Figura 6.

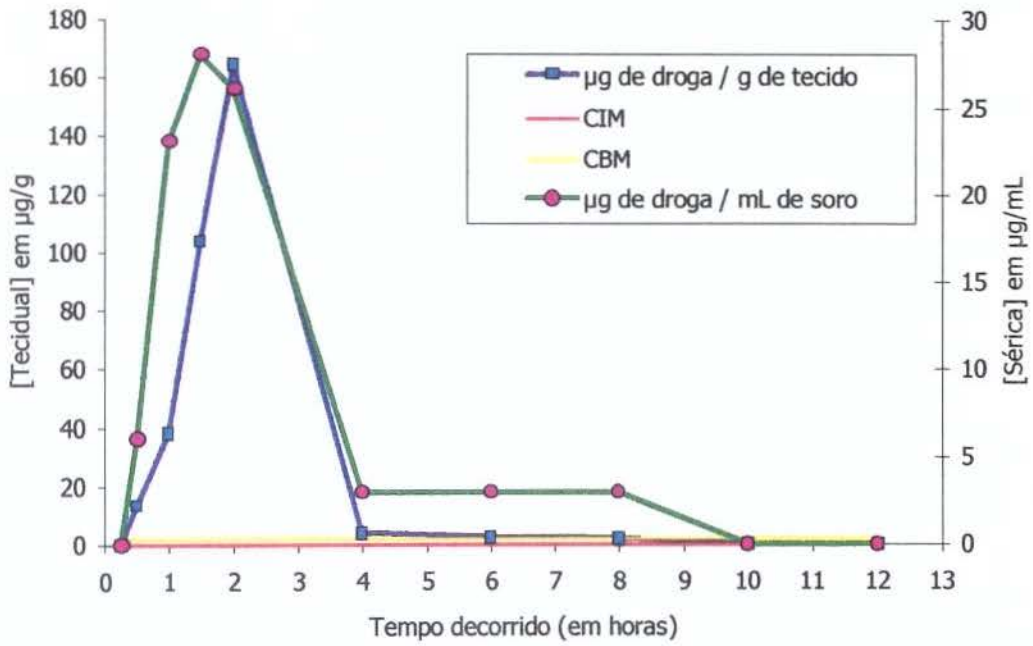


Figura 5 – Representação gráfica dos valores de concentração em função do tempo decorrido, correlacionado com os valores de CIM e CBM.

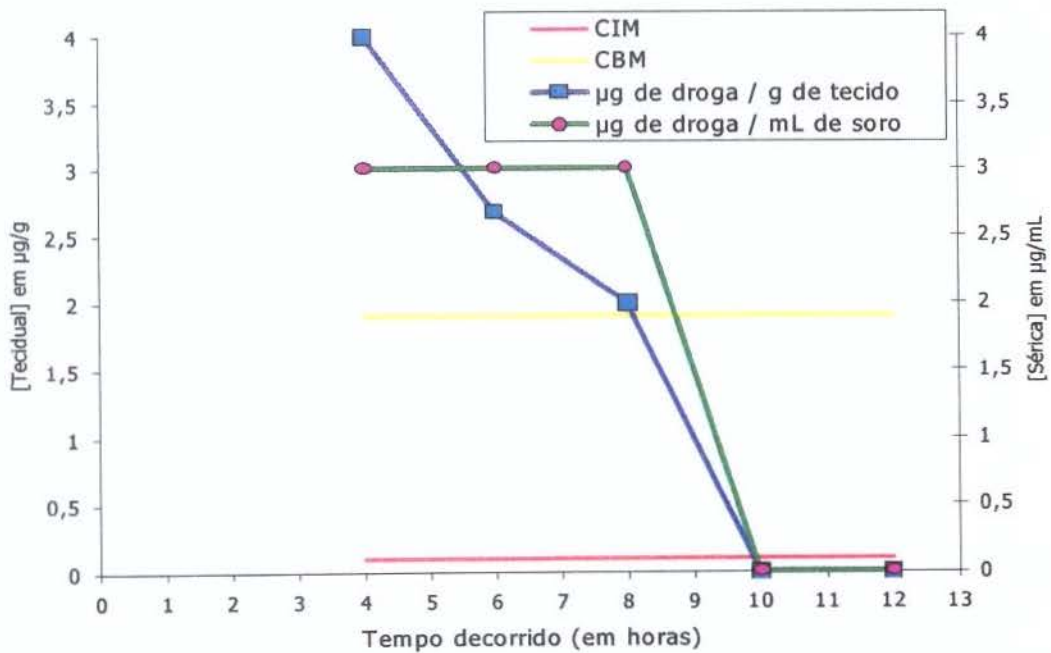


Figura 6 – Detalhe (Figura 5) da representação gráfica dos valores de concentração em função do tempo decorrido, correlacionado com os valores de CIM e CBM.



## 8. DISCUSSÃO

A implantação de esponjas de policlorovinil (PVC), como agente desencadeador de reações do tipo granulomatosa, no dorso de animais, tem sido utilizada (GRINDLAY & WAUGH, 1951; HICKS, 1969; VIZIOLI, 1973; ANDRADE, 1980; GEVARTOSKY, 1984; BARROS, 1989; MATTOS-FILHO, 1990; GROppo, 1996), sendo que sua morfologia e seqüência de formação já estão bem definidas (ANDRADE, 1980; GEVARTOSKY, 1984; MATTOS-FILHO, 1990). Através de análise histológica, confirmamos as características descritas na literatura.

O período de 14 dias após o implante das esponjas foi determinado pelos achados de GROppo (1996), que não encontrou diferenças estatisticamente significantes quando observou a influência sobre as concentrações de amoxicilina, em tecidos granulomatosos induzidos em ratos, em períodos de 7, 14, 21 e 28 dias de evolução da lesão e também pelas características histológicas observadas neste período (ANDRADE, 1980; GEVARTOSKY, 1984; MATTOS-FILHO, 1990).

Os modelos de estudo, nos quais emprega-se tecidos para a observação da difusão de antimicrobianos, são os mais apropriados, visto que existem evidências substanciais de que muitas infecções resultam de organismos que aderem às superfícies. A maior parte das bactérias não produz efeitos patogênicos em fluidos corpóreos, são encontradas em fluidos como resultado da difusão a partir do local de infecção, da contaminação provinda de instrumentação ou da ruptura do tecido (LORIAN, 1989), de qualquer forma, situa-se no tecido o local da verdadeira batalha contra os agentes patogênicos. Assim, escolhemos esse modelo para a observação da farmacocinética da amoxicilina.

O método microbiológico vem sendo muito utilizado, embora haja outras metodologias utilizadas para a determinação das concentrações de amoxicilina (BRITISH PHARMACOPOEIA, 1988; US PHARMACOPOEIA, 1990;

DEVANI et al., 1992; KRAUWINKEL et al., 1993; CHARLES & CHULAVATNATOL, 1993), sendo o primeiro comparável, em termos de precisão, a ensaios com equipamentos tidos como mais precisos, como a cromatografia líquida de alta performance (HSU & HSU, 1992; MOORE et al., 1996).

A utilização de tecidos em ensaios microbiológicos para determinação da presença de antimicrobianos já foi relatada (PIEPER et al., 1985; MATTOS-FILHO et al., 1994; GROPPPO, 1996).

Os resultados de GROPPPO (1996), obtidos sob as mesmas condições experimentais, tais como dose (40mg/kg), período de tempo após a administração (1 hora), período de tempo de evolução da lesão (14 dias) etc., são divergentes dos resultados observados neste estudo. Considerando o período de 1½ hora, os valores para concentração tecidual foram aproximadamente duas vezes maiores que aqueles observados pelo autor. Apesar da similaridade entre os dois trabalhos, fatores como diferenças entre operadores ou pequenas variações na metodologia, podem explicar as divergências.

A utilização de discos de papel em ensaios de sensibilidade a antimicrobianos, tal como usamos, vem desde 1947 (BONDI et al., 1947), sendo que os procedimentos padronizados para realizar este tipo de teste e comparar os diâmetros dos halos de inibição com a concentração inibitória mínima remontam da década de 60 (BAUER et al., 1966; PIDDOCK, 1990).

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) foram concordantes com valores observados por outros autores (PHILIPS, 1991; KONEMAN et al., 1994; GROPPPO, 1996). A concentração bactericida mínima que observamos, que proporcionou uma taxa de 100% de lise bacteriana, não encontrou equiparação na literatura consultada. Porém, sabe-se que as concentrações bactericidas até 32 vezes maiores que a concentração inibitória mínima, são consideradas normais para microrganismos susceptíveis ao antimicrobiano (SHERRIS, 1986).

Os valores de peso úmido dos tecidos granulomatosos não mostraram diferenças estatisticamente significantes, o que tornou possível uma correlação confiável destes com os valores de quantidade antibiótica obtidos, resultando em um valor de concentração ( $\mu\text{g}$  de antimicrobiano/grama de tecido), confirmando as observações de GROPPPO em 1996.

Os resultados obtidos com relação à concentração sangüínea foram divergentes daqueles observados por DAJANI et al. (1994), pois foram aproximadamente duas vezes maiores que aqueles observados pelos autores nos períodos de 1 e 2 horas e similares àqueles obtidos as 6 horas, embora os autores utilizassem estudo em humanos.

Um antimicrobiano deve estar presente em concentrações teciduais e sangüíneas eficazes, isto é, acima da concentração inibitória e bactericida mínima, até que uma nova dose seja repetida (MONTGOMERY, 1991a). Levando-se em consideração a dose que empregamos, esta seria suficiente até 8 horas após a sua administração.

A dosagem empregada na profilaxia contra endocardite bacteriana no regime terapêutico padrão da *American Heart Association*, que é composto por uma dose de 2g (entre 20 a 60mg/Kg, dependendo do peso corporal), por via oral, 1 hora antes do procedimento, é similar à dose que empregamos. Esta pode fornecer níveis séricos e teciduais suficientes para combater a maioria dos patógenos (DAJANI et al., 1997). Este achado é concordante com os de que BOON et al., 1982 e AKIMOTO et al., 1982, que observam que este fármaco promove concentrações teciduais satisfatórias nas infecções bucais agudas.

Não encontramos suporte, com relação à amoxicilina, para a afirmação de DAVEY (1990) de que a concentração tecidual normalmente eleva e diminui mais lentamente nas primeiras horas após a administração, pois o comportamento farmacocinético que observamos, similar para os níveis sangüíneos e teciduais, mostrou rápida elevação e queda de ambos, considerando dez horas após a administração.

Mais importante que os altos e baixos verificados no decorrer dos períodos de estudo, é o fato de que as concentrações, quer sejam sangüíneas ou teciduais, durante 8 horas se mantiveram mais elevadas ou ao menos muito próximas à concentração bactericida mínima e muito acima da concentração inibitória mínima. Este fato é apontado por DAJANI et al. (1994), como sendo a principal característica que deve ser observada para a correta utilização de um antimicrobiano.

Existe na literatura a idéia de que a penetração de agentes quimioterápicos nos locais infeccionados, principalmente nas áreas avasculares, abscessos ou matrizes de fibrina, pode ser reduzida e seria um determinante crítico do resultado do tratamento (FISHMAN & HEWITT, 1970; ROBSON et al., 1974; GEVARTOSKY, 1984). Porém, esta afirmação não pareceu ser verdadeira para a amoxicilina, uma vez que ofereceu níveis significantes no interior do tecido granulomatoso. Isto pode ser reflexo de uma das características do fármaco, a lipossolubilidade.

Poderíamos sugerir, portanto, que a amoxicilina, no modelo empregado, teria boa penetração tecidual e proporcionaria níveis teciduais e sangüíneos acima das concentrações inibitória e bactericida mínimas.

---

## 9. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos podemos concluir que:

- 1 - O método mostrou-se válido para avaliar a difusão e para quantificar a amoxicilina em nível sérico e no tecido granulomatoso no período compreendido entre 30 minutos e 8 horas, porém não detectou as concentrações nos tempos de 15 minutos, 10 e 12 horas.
- 2 - Existe uma correlação direta entre as concentrações séricas e teciduais, entretanto os valores encontrados são diferentes e o pico de concentração em tempos diferentes.
- 3 - Considerando-se o período compreendido entre 30 minutos e 8 horas, tanto no soro sangüíneo quanto no tecido granulomatoso, a amoxicilina ofereceu níveis maiores que as concentrações inibitória mínima e bactericida mínima.

---

## 10. ANEXOS

### 10.1. - ANEXO 1

#### REATIVAÇÃO DA CEPA (INSTRUÇÕES DA ENTIDADE CEDENTE)

- 1 - Desinfecção da ampola com álcool 70%; esterilização da lima com álcool e aquecimento em chama.
- 2 - Abertura da ampola por meio de um corte com a lima sobre a ampola no ponto médio do tampão de algodão.
- 3 - Retirada do tampão de algodão com pinça esterilizada. Com uma pipeta Pasteur estéril, pegar uma pequena quantidade de meio de cultura líquido tipo TSB (caldo tripticase soja), fazer uma suspensão das células e transferi-las para um tubo de ensaio contendo 5,0 mL do mesmo meio.
- 4 - Incubação à temperatura de crescimento do microrganismo, por 24-48 horas.
- 5 - Manutenção da cultura por repiques em meio sólido.

## 10.2. - ANEXO 2

Tabela 6 – Valores de peso úmido (em mg) para cada tecido granulomatoso, provindos dos animais e a média dentro de cada grupo.

Tecido	15 min	30 min	1 hora	1½ hora	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas	10 horas	12 horas
1	19,6	17,9	16,4	25,1	18,7	15,4	24,0	26,1	24,2	20,5
2	25,3	22,2	25,2	17,3	12,7	17,2	24,9	16,2	13,6	15,1
3	23,4	16,3	27,5	14,5	25,4	28,3	14,7	19,6	19,7	19,6
4	16,2	18,2	26,8	16,2	19,6	27,2	17,5	10,8	16,9	15,6
5	17,8	15,0	24,7	15,8	27,1	26,2	19,4	15,2	26,4	13,1
6	19,4	21,8	21,2	28,4	26,0	18,3	25,1	18,2	16,6	23,5
7	19,4	15,5	13,0	15,2	24,7	18,3	13,6	26,2	30,0	22,1
8	24,4	18,9	17,8	25,2	25,5	25,9	17,2	11,9	13,3	21,8
9	23,7	13,8	26,9	24,3	16,1	25,9	23,1	10,0	11,9	23,9
10	19,3	17,2	24,2	24,8	24,5	22,4	24,4	19,1	18,4	20,4
11	18,4	15,0	22,6	15,1	16,6	26,0	16,6	25,8	23,2	16,8
12	20,4	25,9	28,0	13,9	24,6	17,1	15,6	19,4	18,7	15,0
Média	20,61	18,14	22,86	19,65	21,79	22,35	19,68	18,21	19,41	18,95

### 10.3. - ANEXO 3

Tabela 7 – Valores de peso seco (em mg) para cada tecido granulomatoso, provindos dos animais e a média dentro de cada grupo.

Tecido	15 min	30 min	1 hora	1½ hora	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas	10 horas	12 horas
1	3,9	5,7	4,3	3,9	4,1	3,3	4,2	3,4	4,6	4,6
2	5	6,9	5,4	3,2	2,4	3,6	5,6	4,2	3,2	4,3
3	5,1	2,8	3,8	3,7	4,4	4,1	5,8	5,2	4,7	4,5
4	4,5	4,9	4,9	5,1	6	5,2	3,4	3,9	3,7	3,5
5	4,2	3,5	4,5	4,8	5,4	2,9	5,8	2,7	3	5,4
6	3,6	4,6	4,3	7,2	4,1	4,5	5,7	3,9	5,4	3,5
7	4,3	4	4,7	2,2	3,6	5,2	3,4	5,2	5,4	6,4
8	4,2	4,5	5,1	3,6	4,2	4,4	3,6	3	5,4	3,5
9	4,6	3,7	4,8	3,5	4,9	3,4	4,8	4,2	4,2	2,6
10	3,9	4,6	5,4	3,4	3,7	6,8	3,8	2,8	6,8	4,6
11	4,6	3,4	4,7	4,4	4,7	4	3,3	3,8	4,2	4,8
12	4,4	4,8	7	2,1	4,4	4,4	5,4	2,7	4,8	3,9
MÉDIA	4,36	4,45	4,91	3,93	4,33	4,32	4,57	3,75	4,62	4,3



## 10.4. - ANEXO 4

Tabela 8 – Valores dos halos de inibição (em mm) para cada amostra de sangue e a média dentro de cada grupo.

Tecido	15 min	30 min	1 hora	1½ hora	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas	10 horas	12 horas
1	0	10,37	16,08	18,24	17,13	9,31	9,06	9,29	0	0
2	0	11,27	16,22	18,10	16,22	9,42	9,38	8,20	0	0
3	0	13,82	15,97	18,89	17,92	10,17	10,75	8,90	0	0
4	0	12,58	18,82	19,75	18,47	9,06	9,52	8,49	0	0
5	0	12,15	18,13	18,43	17,75	10,71	9,27	9,43	0	0
6	0	11,04	16,53	18,63	18,39	9,52	9,47	9,04	0	0
7	0	13,19	19,94	17,39	20,23	11,01	10,06	8,43	0	0
8	0	11,66	17,31	18,18	18,91	9,11	8,48	8,70	0	0
9	0	11,96	18,51	17,11	15,89	8,94	8,74	8,94	0	0
10	0	12,59	15,58	18,24	17,01	8,80	8,13	8,62	0	0
11	0	12,23	16,75	17,11	16,23	10,04	8,94	8,68	0	0
12	0	13,85	18,21	18,2	19,09	9,40	9,60	7,80	0	0
Média	0	12,23	17,34	18,19	17,77	9,62	9,28	8,71	0	0

## 10.5. - ANEXO 5

Tabela 9 – Valores dos halos de inibição (em mm) para cada tecido granulomatoso e a média dentro de cada grupo.

Tecido	15 min	30 min	1 hora	1½ hora	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas	10 horas	12 horas
1	0	18,19	21,17	24,42	30,19	11,14	7,34	7,72	0	0
2	0	15,81	18,10	25,54	24,66	11,27	9,26	9,94	0	0
3	0	17,13	20,12	26,03	29,00	9,28	10,41	10,63	0	0
4	0	18,11	18,57	26,35	25,88	10,41	11,73	10,45	0	0
5	0	17,50	21,98	24,67	26,09	12,53	9,81	9,77	0	0
6	0	17,06	20,39	25,37	30,63	12,10	10,78	9,83	0	0
7	0	20,42	22,18	24,23	23,32	13,20	9,04	10,36	0	0
8	0	18,31	20,91	27,18	31,28	12,49	9,39	9,95	0	0
9	0	16,59	21,29	24,05	25,38	11,89	11,46	7,87	0	0
10	0	16,62	22,83	22,56	27,23	13,1	9,79	9,13	0	0
11	0	17,44	21,44	23,02	23,42	11,28	10,02	10,68	0	0
12	0	20,41	22,54	25,62	24,04	13,73	11,77	7,71	0	0
Média	0	17,80	20,96	24,92	26,76	11,87	10,07	9,50	0	0

## 11. SUMMARY

Although there are several reports regarding the bacterial resistance to amoxicillin, it is used as a first choice therapy in medicine and dentistry. The recent edition of the guidelines for the prevention of bacterial endocarditis is a clear example of this. In spite of it is widely accept that every antibiotic should achieve higher serum level than the minimum inhibitory concentration for a given bacteria, the blood is not the place where the majority of the infections occur. There are few data about the tissue concentration that the amoxicillin reaches; a greater importance is given to the serum levels of this drug. This aim of this paper was to study the tissue concentration of the amoxicillin. Sixty male rats were implanted the back with 4 PVC sponges. After 14 days of the implantation, the animals received orally 40mg/kg of amoxicillin suspension and were sacrificed in groups of 6 at 15 min, 30 min, 1, 1½, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours after the administration. Blood samples and granulomatous tissues were collected. After the centrifugation of blood samples, 10 µL of sera were distributed in paper disks and, as well the granulomatous tissue were disposed in Petri dishes with Mueller Hinton agar inoculated with  $10^8$  c.f.u. of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). After 18 hours of incubation the inhibition zones were measured and scored for analysis. A regression curve with the inhibition zones versus the logarithm concentrations of amoxicillin was previously done. It was observed that the drug achieved in blood and tissue concentrations above the minimum inhibitory and bactericide concentrations ones within the period of 30min and 8 hours after the administration. It was concluded that with the dose studied the intervals of 6/6 hours or 8/8 hours would be adequate to keep sufficient levels of the antibiotic.

KEY WORDS: beta-lactamics antibiotics, drugs bioavailability, pharmaceutical microbiology, microbial susceptibility testing.

---

## 12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

1. AKIMOTO, Y., KANEKO, K., TAMURA, T. Amoxicillin concentrations in serum, jaw cyst, and jawbone following a single oral administration. J. oral maxillofac. Surg., Orlando, v.40, n.5, p.287-293, May 1982.
2. \_\_\_\_\_. et al. Amoxicillin concentration in pus from abcess caused by odontogenic infection. Gen. Pharmac., v.25, n.1, p.111-113, Jan. 1994.
3. AMATO-NETO, V. et al. Antibióticos na prática médica. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 1985.
4. ANDRADE, E.D. Estudo histológico e histofotométrico do tecido de granulação de ratos em condições normais e sob ação de drogas antiinflamatórias. Piracicaba, 1980. 48p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
5. BALOWS, A. Current techniques for susceptibility testing. Springfield: C.C. Thomas. 1974. pp. 3-5. Apud PIDDOCK, L.J.V. Op. cit. Ref. 58.
6. BARROS, P.P. Estudo da influência da tripsina, quimotripsina e paracetamol, no desenvolvimento do tecido de granulação, em ratos. Piracicaba, 1989. 94p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

---

\* De acordo com a NBR-6023, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), de 1989. Abreviatura dos periódicos conforme o "World List Of Scientifical Periodical".

- 
7. BARRY, A.L., FAY, G.D. The amount of agar in antimicrobial disc susceptibility test plates. Am. J. clin. Path., Philadelphia, v.59, n.2, p.196-198, Feb. 1973.
  8. BARZA, M., WEINSTEIN, L. Penetration of antibiotics into fibrin loci in vivo. I. Comparison of penetration of ampicillin into fibrin clots, abscesses, and interstitial fluid. J. infec. Dis., Chicago, v.129, n.1, p.59-65, Jan. 1974.
  9. BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardised single disc method. Am. J. clin. Path., Philadelphia, v.45, p.493-496, 1966. Apud: PIDDOCK, L.J.V. Op. cit. Ref. 58.
  10. BONDI, A. et al. Routine method for rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. Am. J. med. Sci., Philadelphia, v.213, p.221-225, 1947. Apud PIDDOCK, L.J.V. Op. cit. Ref. 58.
  11. BOON, R.J. et al. Distribution of amoxicillin and clavulanic acid in infected animals and efficacy against experimental infections. Antimicrob. Ag. Chemother., Washington, v.22, n.3, p.369-375, Sept. 1982.
  12. BRENNER, V.C., SHERRIS, J.C. Influence of different media and blood on the result of diffusion antibiotic susceptibility tests. Antimicrob. Ag. Chemother., Washington, v.1, n.2, p.116-122, Feb. 1972.
  13. BRICELAND, L.L., PASKO, M.T., MYLOTTE, J.M. Serum bactericidal rate as a measure of antibiotic interactions. Antimicrob. Ag. Chemoter., Washington, v.31, n.5, p.679-685, May 1987.
  14. BRITISH PHARMACOPOEIA. Her majesty's stationary office. London, v.1, p.31-32, 1988.

- 
15. CARNEY, D.N. et al.. Bacteremia due to *Staphylococcus aureus* in patients with cancer: report on 45 cases and a review of the literature. Rev. Infect. Dis., Chicago, v.4, n.1, p.1-12, Jan./Feb. 1985.
  16. CHARLES, B., CHULAVATNATOL, S. Simple analysis of amoxicillin in plasma by high performance liquid chromatography with internal standardization and ultraviolet detection. Biomed Chromatogr., London, v.7, n.4, p.204-207, July 1993.
  17. CROYDON, E.A.P., SUTHERLAND, R. Alfa-amino-p-hydroxybenzyl- penicillin (BRL 2333), a new semisynthetic penicillin: absorption and excretion in man. Antimicrob. Ag. Chemother., Washington, v.10, p.427-430, 1970.
  18. DAJANI, A.S., BAWDON, R.E., BERRY, M.C. Oral amoxicillin as prophylaxis for endocarditis: what is the optimal dose? Clin. Inf. Dis., Chicago, v.18, n.2, p.157-160, Feb. 1994.
  19. \_\_\_\_\_ et al. Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. J. Am. med. ass., Chicago, v.277, n.22, p.1794-1801, June 1997.
  20. DAVEY, P. Tissue penetration. Practitioner, London, v.234, n.1497, p.1067-1069, Dec. 1990.
  21. DEVANI, M.B., PATEL, I.T., PATEL, T.M. Spectrophotometric determination of amoxicillin and its dosage forms. J. Pharm. Biomed. Anal., v.10, n.5, p.355-358, May 1992.

- 
22. EAGLE, H., FLEISCHMAN, R., LEVY, M. "Continuous" vs "discontinuous" therapy with penicillin. The effect of the interval between injections on therapeutic efficacy. N. Engl. J. Med., Lawrence, v.248, p.481-488, 1953. Apud BARZA, M., WEINSTEIN, L. Op. cit. Ref. 8.
23. FARIAS, W.V. et al. Sensitivity pattern of 117 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from 12 hospitals. Revta. Ass. med. bras., São Paulo, v.43, n.3, p.199-204, jul./set. 1997.
24. FISHMAN, L.S., HEWITT, W.L. The natural penicilline. Med. clin. N. Am., Philadelphia, v.54, n.5, p.1081-1099, Sept. 1970.
25. FONSECA, A.L. Antibióticos na clínica diária. 3.ed. Rio de Janeiro: EPUME, 1988.
26. GARRET, E.R. Kinetics of antimicrobial action. Scand. J. infec. Dis. Suppl., Stockholm, n.14, p.54-85, 1978.
27. GEVARTOSKY, I.M. Estudo histológico dos efeitos de três drogas antibióticas sobre a evolução do tecido de granulação induzido em ratos, por meio da implantação de esponja. Piracicaba, 1984. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
28. GIBALDI, M., SCHWARTZ, M.A. Apparent effect of probenecid on the distribution of penicillins in man. Clin. Pharmac. Ther., Saint Louis, v.9, p.345-349, 1968. Apud BARZA, M., WEINSTEIN, L. Op. cit. Ref. 8.
29. GORDON, R.C., REGAMEY, C., KIRBY, W.M.M. Comparative clinical pharmacology of amoxicillin and ampicillin administered orally. Antimicrob. Ag. Chemother., Washington, v.1, n.6, p.504-507, June 1972.

- 
30. GREENBERG, R.N. et al. Microbiologic and antibiotic aspects of infections in the oral and maxillofacial region. J. oral Surg., Chicago, v.37, n.12, p.873-884, Dec. 1979.
31. GRINDLAY, J.H., WAUGH, J.M. Plastic sponge with acts as a framework for living tissue. Archs Surg., Chicago, v.63, p.288-293, 1951.
32. GROppo, F.C. Influência da evolução do tecido granulomatoso sobre a biodisponibilidade da amoxicilina. Estudo ex vivo, em ratos. Piracicaba, 1996. 70p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
33. HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E. Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 1996.
34. HICKS, R. The evaluation of inflammation induced by material implanted subcutaneously in the rat. J. Pharm. Pharmac., London, v.21, n.9, p.581-588, Sept. 1969.
35. HSU, M-C., HSU, P-W. High-performance liquid chromatographic method for potency determination of amoxicillin in commercial preparations and for stability studies. Antimicrob. Ag. Chemother., Washington, v.36, n.6, p.1276-1279, June 1992.
36. ITO, I.Y. et al. TTC: cloreto de trifeniltetrazolio na detecção da atividade antimicrobiana. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS, 12., 1995, Águas de São Pedro. Anais ... Águas de São Pedro, 1995. p.106 [Abstract, 210].



- 
37. JUNQUEIRA, M.E.R. Estudo histológico dos efeitos de drogas antiinflamatórias (betametasona, papaína e piroxican) sobre a evolução do tecido de granulação induzido em ratos. Piracicaba, 1983. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
38. KAMIYA, Y. Experiences and studies on antimicrobial resistance in Japan: useful lessons for developing countries. East Afr. Med. J., Kenya, v.74, n.3, p.174-176, Mar. 1997.
39. KARLOWSKY, J., FERGUSON, J., ZHANEL, G. A review of commonly prescribed oral antibiotics in general dentistry. J. Can. dent. Ass., Ottawa, v.59, n.3, 292-294, Mar. 1993.
40. KONEMAN, E.W. et al. Introduction to diagnostic microbiology. 2.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994.
41. KOROLKOVAS, A. Análise farmacêutica. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.
42. KRAUWINKEL, W.J.J., KAMERMANS-VOLKERS, N.J., ZIJTVELD, J. Determination of amoxicillin in human plasma by high-performance liquid chromatography and solid phase extraction. J. Chromat., V.617, n.2, p.334-338, Aug. 1993.
43. LEWIS, M.A.D., MCGOWAN, D., MACFARLANE, T.W. Short-course high-dosage amoxicillin in the treatment of acute dento-alveolar abscess. Br. dent. J., London, v.161, n.8, p.299-302, Oct. 1986.
44. LORIAN, V. In vitro simulation of in vivo conditions: physical state of the culture medium. J. clin. Microbiol., Washington, v.27, n.11, p.2403-2406, Nov. 1989.

- 
45. MCCARTNEY, A.C. Changing trends in infective endocarditis. J. clin. Path., London, v.45, n.11, p.945-948, Nov. 1992.
46. MATTOS FILHO, T.R. Efeitos da administração oral de enzimas proteolíticas e paracetamol no tecido de granulação de ratos. Piracicaba, 1990. 122p. Tese (Livre-Docência em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
47. \_\_\_\_\_, RANALI, J., BARROS, P.P. Presence of antibiotic in granulation tissue. J. dent. Res., Washington v.73, n.4, p. 773, Apr. 1994.
48. MONTGOMERY, E.H. Antibióticos antibacterianos. In: NEIDLE, E.A., YAGIELA, J.A. Farmacologia e terapêutica para dentistas. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991a. p.412-446.
49. \_\_\_\_\_. Princípios e mecanismos da antibioticoterapia. In: NEIDLE, E.A., YAGIELA, J.A. Farmacologia e terapêutica para dentistas. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991b. p.397-411.
50. MOORE, T.D. et al. Stability of amoxicilin-clavulanate in bactec mdium determined by high-performance liquid chromatography and bioassay. J. clin. Microbiol., Washington, v.34, n.5, p.1321-1322, May 1996.
51. NATHWANI, D., WOOD, M. Penicilins. A current review of their clinical pharmacology and therapeutic use. Drugs, Sydney, v.45, n.6, p.866-894, June 1993.
52. NAVASHIN, S.M. et al. A dynamic model for in-vitro evaluation of antimicrobial action by simulation of the pharmacokinetic profiles of antibiotics. J. Antimicrob. Chemother., London, v.23, n.3, p.389-399, Mar. 1989.

- 
53. NEU, H.C. Penicilinas - microbiologia, farmacologia e uso clínico. In: KAGAN, B.M. Terapia antimicrobiana. 3.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1982. Cap.3, p.17-29.
54. \_\_\_\_\_, WINSHELL, E.B. In vitro antimicrobial activity of 6[d(-) a-amino-p-hydroxyphenylacetamido] penicillanic acid, a new semisynthetic penicillin. Antimicrob. Ag. Chemother., Washington, v.10, p.407-410, 1970a.
55. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. Pharmacological studies of 6[d(-)a-amino-p-hydroxyphenylacetamido] penicillanic acid in humans. Antimicrob. Ag. Chemother., v.10, p.423-426, 1970b.
56. PERL, T.M. & GOLUB, J.E. New approaches to reduce *Staphylococcus aureus* nosocomial infection rates: treating *S. aureus* nasal carriage. Ann. Pharmacother., v.32, n.1, p.S7-S16, Jan. 1998.
57. PHILIPS, I. et al. A guide to sensitivity testing. J. Antimicrob. Chemother., London, v.27, p.1-50, 1991 [Supplement D].
58. PIDDOCK, L.J.V. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. J. appl. Bact., Oxford, v.68, n.4, p.307-318, Apr. 1990.
59. PIEPER, R. et al. Penetration of penicillins into cardiac valves and auricles of patients undergoing open-heart surgery. Scand. J. thorac. cardiovasc. Surg., Stockholm, v.19, n.1, p.49-53, 1985.
60. ROBSON, M.C. et al. The efficacy of sistemics antibiotics in the treatment of granulating wounds. J. surg. Res., San Diego, v.16, n.4, p.299-306, Apr. 1974.

- 
61. ROMAN, R.S. et al Rapid geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. Clin. Infect. Dis., Chicago, v.25, n.3, p.698-705, 1997.
62. SHERRIS, J.C. Problems in *in vitro* determination of antibiotic tolerance. Antimicrob. Ag. Chemother., Washington, v.30, n.5, p.633-636, Nov. 1986.
63. SUTHERLAND, R., ROLINSON, G.N. a-Amino-p-hydroxybenzyl penicillin (BRL 2333), a new semisynthetic penicillin: *in vitro* evaluation. Antimicrob. Ag. Chemother., Washington, v.10, p.411-415, 1970.
64. UNITED STATES PHARMACOPEIA XXII. The national formulary XVII, Rockville, p.80-84, 1990.
65. VIZIOLI, M.R. Dynamics of fibrillar components in rat sponge induced granulation tissue. Acta anat., Basel, v.85, n.3, p.358-377, 1973.
66. VOGELMAIN, B., CRAIG, W.A. Kinetics of antimicrobial activity. J. Pediat., Saint Louis, v.108, n.5 pt.2, p.835-840, May 1986.
67. WALDVOGEL, F.A. *Staphylococcus aureus*. In: MANDELL, G.L. et al. Principles and practice of infectious diseases. 3.ed. New York: Churchill Livingstone, 1990. Apud KONEMAN, E.W. et al. Op. cit. Ref. 40.
68. ZAK, O., O'REILLY, T. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. Antimicrob. Ag. Chemother., London, v.35, n.8, p.1527-1531, Aug. 1991.