

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MARCELO DE SOUZA JUNQUEIRA

CIRURGIÃO-DENTISTA

INFLUÊNCIA DO DICLOFENACO SÓDICO NA
ABSORÇÃO, CONCENTRAÇÃO SÉRICA E
EXCREÇÃO DA AMOXICILINA –
ESTUDO EM RATOS

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Doutor
em Odontologia – Área de Farmacologia,
Anestesiologia e Terapêutica.**

PIRACICABA – SP
2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MARCELO DE SOUZA JUNQUEIRA

CIRURGIÃO-DENTISTA

**INFLUÊNCIA DO DICLOFENACO SÓDICO NA
ABSORÇÃO, CONCENTRAÇÃO SÉRICA E
EXCREÇÃO DA AMOXICILINA –
ESTUDO EM RATOS**

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Doutor
em Odontologia – Área de Farmacologia,
Anestesiologia e Terapêutica.**

**Orientador: Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo**

Banca examinadora:

**Prof. Dr. José Ranali
Profa. Dra. Juliana Cama Ramacciatto
Profa. Dra. Maria Cristina Volpato
Prof. Dr. Rogério Heládio Lopes Motta
Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho**

**PIRACICABA – SP
2006**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

J968i

Junqueira, Marcelo de Souza.

Influência do diclofenaco sódico na absorção, concentração sérica e excreção da amoxicilina – Estudo em ratos. / Marcelo de Souza Junqueira. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.

Orientadores: Thales Rocha de Mattos Filho,
Francisco Carlos Groppo

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Medicamentos – Interações. 2. Diclofenato. 3. Testes de sensibilidade bacteriana. 4. Medicamentos – Biodisponibilidade. 5. Antibióticos beta-lactâmicos. I. Mattos Filho, Thales Rocha de. II. Groppo, Francisco Carlos. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em inglês: Influence of sodium diclofenac on absorption, serum concentration and excretion of amoxicillin – In rats

Palavras-chave em inglês (Keywords): 1. Drugs – interactions. 2. Diclofenac. 3. Microbial sensitivity tests. 4. Drugs – bioavailability. 5. Beta-lactam antibiotics

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca examinadora: José Ranali, Juliana Cama Ramacciato, Maria Cristina Volpato, Rogério Heládio Lopes Motta, Thales Rocha de Mattos Filho

Data da defesa: 24/02/2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 24 de Fevereiro de 2006, considerou o candidato MARCELO DE SOUZA JUNQUEIRA aprovado.

Thales

PROF. DR. THALES ROCHA DE MATTOS FILHO

Rogério

PROF. DR. ROGÉRIO HELÁDIO LOPES MOTTA

Juliana

PROFa. DRa. JULIANA CAMA RAMACCIATO

Maria Cristina

PROFa. DRa. MARIA CRISTINA VOLPATO

Jose Ranali

PROF. DR. JOSE RANALI

DEDICATÓRIA

A DEUS, pai e senhor do homem e da ciência, aquele que nos dá a sabedoria necessária para podermos compreender um pouco das maravilhas e dos encantos da sua criação.

À minha querida esposa Márcia pelo exemplo de amor à vida, pelo apoio que dela recebi nos momentos mais difíceis no decorrer da elaboração desse trabalho, pela sua coragem e companheirismo, enfim, pelo seu amor. Aos nossos filhos Mateus, Michele, Daniel, Lucas e Verônica pelo carinho dispensado e por me ensinarem a contemplar as coisas simples e a navegar nas águas da emoção.

A meus pais CARMEN E LUIZ, pelos exemplos de honestidade, seriedade e fé que marcaram a minha vida.

Aos meus irmãos RICARDO E MARCO AURÉLIO, pelo muito que me auxiliaram e me apoiaram.

dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A THALES ROCHA DE MATTOS FILHO, minha gratidão pela sua paciência e amizade verdadeira, por compartilhar comigo um pouco de toda sua experiência e sabedoria, enfim, por me tomar como seu orientado e direcionar sempre minha carreira. Mestre, meu mais profundo respeito e admiração.

A FRANCISCO CARLOS GROPPPO, profissional de extrema competência que tive o privilégio de conhecer e poder confiar. Obrigado pelo apoio, pela confiança e pelo incentivo em mim depositados.

AGRADECIMENTOS

À UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, por meio do Reitor:

JOSÉ TADEU JORGE.

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA (FOP – Unicamp),
por meio do diretor: THALES ROCHA DE MATTOS FILHO.

À Coordenação Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP, por meio
de seu Coordenador: PEDRO LUIZ ROSALEN.

À FRANCISCO CARLOS GROPPPO, Coordenador do Curso de Pós-
Graduação em Odontologia da FOP.

Ao CAPES, Centro de aperfeiçoamento de Pessoal Especializado, pela
concessão de bolsa de estudo para realização desse trabalho.

À MARIA CRISTINA VOLPATO, exemplo de profissionalismo e
dedicação.

A JOSÉ RANALI, pelo apoio e incentivo.

A EDUARDO DIAS DE ANDRADE, incentivador e mestre dedicado.

Aos amigos da pós: ROGÉRIO, FÁBIO, SIMONE, PATRÍCIA, VANESSA,
CARLA E CARINA.

A JOSÉ CARLOS GREGÓRIO, técnico do Laboratório de Farmacologia,
pelo apoio e companheirismo.

À MARIA ELISA DOS SANTOS, secretária da Área de Farmacologia,
Anestesiologia e Terapêutica, pela sua disponibilidade e simpatia.

À ÉRICA ALESSANDRA PINHO, secretária da Coordenadoria do
Programa de Pós-Graduação da FOP – Unicamp.

Aos ANIMAIS utilizados para o desenvolvimento da ciência em benefício da humanidade.

A todos os amigos e pessoas que me apoiaram e incentivaram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	página
LISTAS	01
LISTA DAS ILUSTRAÇÕES PRESENTES NO TEXTO	01
LISTA DE ABREVIATURAS	02
RESUMO	04
ABSTRACT	05
1. INTRODUÇÃO	06
2. REVISÃO DA LITERATURA	08
2.1. MÉTODOS DE DOSAGEM DE ANTIMICROBIANOS	08
2.2. TESTE DE SENSIBILIDADE BACTERIANA	10
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.4. AMOXICILINA	12
2.5. DICLOFENACO	15
3. PROPOSIÇÃO	18
4. MATERIAL E MÉTODO	19
4.1. ANIMAIS	19
4.2. FÁRMACOS UTILIZADOS	19
4.3. ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS	19
4.4. OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 10 ⁸ u.f.c./mL	21
4.5. DISCOS	21
4.6. MEIOS DE CULTURA	22
4.7. MICROORGANISMO	22
4.8. OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO	22
4.9. COLETA E ANÁLISE DAS AMOSTRAS	23
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5. RESULTADOS	26
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	52
ANEXO 1	52
ANEXO 2	54
ANEXO 3	55
ANEXO 4	56
ANEXO 5	57
ANEXO 6	58
ANEXO 7	59
ANEXO 8	60
ANEXO 9	61
ANEXO 10	62
ANEXO 11	63
ANEXO 12	64
ANEXO 13	65

LISTAS

Lista das ilustrações presentes no texto.

	página
Tabela 1. Diâmetros, em mm, dos halos de inibição correlacionados com as quantidades de amoxicilina, em µg.	26
Gráfico 1. Curva padrão ou de regressão de amoxicilina.	27
Gráfico 2. Representação gráfica dos valores médios da quantidade de amoxicilina, em µg/mL, que atravessou a mucosa gástrica dos animais dos grupos G1 e G2, em função do tempo.	28
Gráfico 3. Representação gráfica dos valores médios da quantidade de amoxicilina, em µg/mL, que atravessou a mucosa duodenal dos animais dos grupos D1 e D2, em função do tempo.	29
Gráfico 4. Representação gráfica, em função do tempo, dos valores médios da concentração sérica, em µg/mL, de amoxicilina obtidos dos animais dos grupos S1 e S2.	30
Gráfico 5. Médias, em função do tempo, da concentração urinária, em µg/mL, de amoxicilina obtidas dos animais dos grupos R1 e R2, em função do tempo.	31
Figura 1. Obtenção da concentração de 10^8 u.f.c./mL.	52
Figura 2. Obtenção da curva padrão.	54
Figura 3. Análise das amostras.	55
Tabela 2. Diâmetros, em mm, dos halos de inibição obtidos das alíquotas de cada animal dos grupos G1 e G2, e suas médias, em função do tempo.	56
Tabela 3. Diâmetros, em mm, dos halos de inibição obtidos das alíquotas de cada animal dos grupos D1 e D2, e suas médias, em função do tempo.	57
Tabela 4. Diâmetros, em mm, dos halos de inibição obtidos das alíquotas séricas de cada animal dos grupos S1 e S2, e suas médias, em função do tempo.	58

Tabela 5. Diâmetros, em mm, dos halos de inibição obtidos das alíquotas urinárias de cada animal dos grupos R1 e R2, e suas médias, em função do tempo.	59
Tabela 6. Médias dos valores da concentração de amoxicilina, em µg/mL, obtidos das alíquotas de cada animal dos grupos G1 e G2, em função do tempo.	60
Tabela 7. Médias dos valores da concentração de amoxicilina, em µg/mL, obtidos das alíquotas de cada animal dos grupos D1 e D2, em função do tempo.	61
Tabela 8. Médias dos valores da concentração de amoxicilina, em µg/mL, obtidos das alíquotas séricas de cada animal dos grupos S1 e S2, em função do tempo.	62
Tabela 9. Médias dos valores da concentração de amoxicilina, em µg/mL, obtidos das alíquotas urinárias de cada animal dos grupos R1 e R2 em função do tempo.	63
Figura 4. Halos de inibição obtidos com as amostras de urina dos animais após duas horas da administração intragástrica das drogas.	64

Lista das abreviaturas presentes no texto.

%	por cento
°C	graus Celsius
&	e
µg	micrograma
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
AINEs	antiinflamatórios não esteroidais
ATCC	american type culture collection (coleção americana de culturas)

BHI	brain heart infusion (infuso de cérebro coração)
CIM	concentração inibitória mínima
COX	cicloxygenase(s)
<i>et al.</i>	e colaboradores
g	grama
g/dia	grama por dia
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
LPP	ligação às proteínas plasmáticas
mg	miligrama
mg/Kg	miligrama por quilograma
mg/Kg/dia	miligrama por quilograma por dia
mg/mL	miligrama por mililitro
MHA	Mueller Hinton agar (ágar Mueller Hinton)
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetro
n	número de animais por grupo
nm	nanômetro
PLPs	proteínas de ligação às penicilinas
R ²	R-quadrado
rpm	rotações por minuto
S.P.F.	specific pathogen free (livre de patógenos específicos)
TSA	tryptone soya agar (ágar triptona soja)
u.f.c.	unidades formadoras de colônias
u.f.c./mL	unidades formadoras de colônias por mililitro

RESUMO

O uso de antimicrobianos e de antiinflamatórios é prática comum na odontologia, embora haja escassez de trabalhos sobre seu uso simultâneo. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar, em ratos, os efeitos do diclofenaco sódico na absorção, concentração sérica e excreção da amoxicilina utilizando a técnica de perfusão tecidual e o método microbiológico. Foram utilizados 108 ratos Wistar machos (12 grupos, n= 9), com peso entre 150 e 200 g. Foram administrados aos animais: amoxicilina 25 mg/Kg (grupos: G1, D1, S1 e R1), diclofenaco sódico 2,5 mg/Kg + amoxicilina 25 mg/Kg (grupos: G2, D2, S2 e R2) e 1,0 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% (grupos: G3, D3, S3 e R3). As drogas foram administradas por injeção intraluminal aos animais dos grupos G1, G2, G3, D1, D2 e D3 e por via oral aos animais dos grupos S1, S2, S3, R1, R2 e R3. Foram avaliadas nos tempos de 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos as concentrações plasmáticas e urinárias de amoxicilina e a absorção gastrointestinal “in vitro” do antimicrobiano. O diclofenaco sódico causou uma redução significativa na absorção intestinal e um aumento na excreção renal do antimicrobiano em ratos, com conseqüente diminuição da sua concentração sérica. Portanto, em algumas situações clínicas, a eficácia da amoxicilina poderia ser prejudicada pela sua co-administração com o diclofenaco sódico.

PALAVRAS-CHAVE: medicamentos – interações, diclofenaco, testes de sensibilidade bacteriana, medicamentos – biodisponibilidade, antibióticos beta-lactâmicos.

ABSTRACT

The prescription of antibiotics associated to anti-inflammatory drugs is common in dentistry; however its effects have not been studied enough. Thus, the aim of this work was to evaluate the influence of sodium diclofenac on absorption, serum concentration and excretion of amoxicillin, in rats, by the microbiologic and tissue perfusion methods. The sample consisted of 108 male Wistar rats (12 groups, 9 rats each), weighing 150–200 g. The animals were given: amoxicillin 25 mg/Kg (groups G1, D1, S1 and R1), sodium diclofenac 2.5 mg/Kg plus amoxicillin 25 mg/Kg (groups G2, D2, S2 and R2) and 1.0 mL of solution of sodium chloride 0.9% (groups G3, D3, S3 and R3). The animals in the groups G1, G2, G3, D1, D2 and D3 were administered drugs by intra-luminal injection and the animals in the groups S1, S2, S3, R1, R2 and R3 were administered drugs *p.o.* After 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 and 360 minutes, were evaluated the blood and urine concentrations of amoxicillin and the “in vitro” absorption of the antibiotic. Sodium diclofenac had decreased the intestinal absorption, increased renal excretion and, consequently, decreased the serum concentration of the amoxicillin. Thus, sodium diclofenac could decrease the efficacy of amoxicillin under some clinical situations.

KEY WORDS: drug - interaction, diclofenac, antimicrobial susceptibility testing, drugs – bioavailability, beta-lactamic antibiotics.

1. INTRODUÇÃO

Quando duas ou mais drogas são administradas simultaneamente, uma pode influenciar o perfil farmacocinético (absorção, distribuição, metabolismo ou excreção) ou farmacodinâmico da outra. Essa interação medicamentosa pode ser desejável ou indesejável. Entre os fatores que contribuem para o aumento das interações medicamentosas indesejáveis podemos citar o seu desconhecimento por parte dos profissionais de saúde, a administração simultânea de vários fármacos, a automedicação, as doenças crônicas e o uso de medicamentos com vários princípios ativos (PRADO *et al.*, 2001; SCHELLACK, 2005).

A amoxicilina é uma penicilina semi-sintética de amplo espectro usada como droga de primeira escolha em várias situações na medicina e na odontologia. Trata-se de um antimicrobiano betalactâmico não resistente às betalactamases, eliminado na forma ativa pelos rins. A excreção urinária das penicilinas e cefalosporinas é retardada pela probenecida (NEIDLE *et al.*, 1998).

O diclofenaco sódico é um antiinflamatório não esteroide derivado do grupo do ácido fenilacético (MORAN, 1990; FRANCO, 1995), comumente empregado em associação com a amoxicilina na clínica diária. Possui alto grau de atividade antiinflamatória e analgésica, diminui a permeabilidade capilar, inibe as ciclooxigenases e a prostaglandina-sintetase, diminuindo a síntese e liberação de prostaglandinas (FERREIRA *et al.*, 1971; FERREIRA, 1972; MONCADA *et al.*, 1975; MINTA & WILLIAMS, 1985; FRIMAN *et al.*, 1986; ABRAMSON *et al.*, 1990). É extensa e rapidamente metabolizado no fígado e excretado na urina (GEIGY, 1988; TODD & SORKIN, 1988).

O diclofenaco sódico e a amoxicilina apresentam importantes interações medicamentosas indesejáveis com outras drogas, que podem resultar em um grande número de complicações clínicas (MERLE-MELET *et al.*, 1992; MUELLER *et al.*, 1993; WESTPHAL *et al.*, 1995; SCHOENMAKERS *et al.*, 1999; NEIDLE *et al.*, 1998; FONSECA, 2001).

JUNQUEIRA (2002) e GROPPPO *et al.* (2004) concluíram, em trabalho experimental, que a associação entre amoxicilina e diclofenaco sódico causa uma redução significativa na concentração sérica e tecidual do antimicrobiano em ratos. Entretanto, esses autores não estudaram os possíveis mecanismos que geraram o problema.

O presente estudo teve a finalidade de investigar os prováveis parâmetros farmacocinéticos da interação entre o diclofenaco sódico e a amoxicilina, em ratos, utilizando o método microbiológico e o método de perfusão tecidual.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – MÉTODOS DE DOSAGEM DE ANTIMICROBIANOS

O tempo de tratamento com um agente antimicrobiano pode ser definido como o tempo durante o qual a concentração do agente é maior do que sua concentração inibitória mínima (CIM) frente ao patógeno, no local da infecção (BARZA, 1978). Entretanto, nas áreas de baixa vascularização e grande volume infeccioso, a concentração da droga é muito mais baixa que a do soro (PALLASCH, 1996).

Drogas não-lipofílicas, como a amoxicilina, são confinadas no fluido extracelular que constitui aproximadamente 20% do tecido corporal, apresentando níveis teciduais totais menores que os níveis séricos (CARS, 1990).

Várias técnicas têm sido desenvolvidas com a finalidade de avaliar adequadamente a quantidade de agentes antimicrobianos em amostras muito pequenas de fluidos ou tecidos corporais (SABATH, 1978).

Dentre os métodos utilizados para a determinação da concentração de antimicrobianos em fluidos biológicos podemos citar: a mercurimetria (BRITISH PHARMACOPOEIA, 1988), a cromatografia líquida de alta eficiência (VREE *et al.*, 1978; CHARLES & CHULAVATNATOL, 1993), o método microbiológico (KOROLKOVAS, 1988), a iodometria, o método óptico (US PHARMACOPEIA, 1990) e a espectrofotometria em ultravioleta (DEVANI *et al.*, 1992).

O método microbiológico foi utilizado por PIEPER *et al.* (1985) para a determinação dos níveis séricos e teciduais de cloxacilina e benzilpenicilina em humanos.

GROPPO (1996), utilizando o método microbiológico, determinou a concentração sérica e tecidual de amoxicilina, 60 minutos após sua administração em ratos.

Estudos comparativos entre o método microbiológico e o método cromatográfico de alta eficiência (CLAE) apontam para similaridade de resultados obtidos (HSU & HSU, 1992; MOORE *et al.*, 1996).

Vários métodos são descritos na literatura para a obtenção de amostras com o objetivo de determinar a concentração de antimicrobianos nos fluidos corporais. LIM *et al.* (2000) descreveram um método simples para coleta e detecção de amoxicilina na urina utilizando tiras para teste de glicosúria e o método microbiológico. KRAUS (1980) descreveu seis métodos para coleta de urina em ratos: reflexo de esvaziamento sob estimulação periódica ou massagem, cistocentese, cistotomia ou fístula de bexiga urinária, “coleta livre”, cateterização uretral de animais imobilizados ou anestesiados, e cateterização de machos por drenagem externa (prepucial).

Os parâmetros farmacocinéticos de agentes antimicrobianos se correlacionam bem com a eficácia terapêutica em modelos animais, sempre que parâmetros farmacodinâmicos são levados em consideração (DALHOFF & ULLMANN, 1990). Experimentos clínicos têm mostrado a efetividade de testes farmacológicos em animais na maioria dos casos, e que os esforços para seus aperfeiçoamentos têm sido importantes (GAUNT, 1977).

Com o objetivo de investigar os efeitos do lansoprazole e da claritromicina na distribuição de [¹⁴C]amoxicilina, em ratos, ENDO *et al.* (2001) utilizaram a técnica de perfusão tecidual. Esta técnica permitiu a determinação precisa da distribuição do antimicrobiano nas amostras biológicas dos estudos *in vivo* e *in vitro* realizados.

2.2 - TESTE DE SENSIBILIDADE BACTERIANA

O primeiro teste de sensibilidade bacteriana para o *Staphylococcus aureus* e penicilina foi realizado na década de 20 por Fleming (BALOWS, 1974).

A utilização de discos de papel de 6,5 mm de diâmetro, como os usados hoje, foi descrita primeiramente por BONDI, em 1947.

Os testes de sensibilidade bacteriana a antibióticos são realizados em placas de Petri semeadas com inóculo entre 10⁶ a 10⁸ u.f.c./mL. No método de difusão em ágar, discos de papel contendo uma quantidade precisa da droga são posicionados sobre o meio semeado e, após incubação, os diâmetros dos halos são comparados com a concentração inibitória mínima (CIM) previamente estabelecida (BAUER *et al.*, 1966; PIDDOCK, 1990; KONEMAN *et al.*, 1992).

Várias sugestões são apresentadas na literatura para melhorar o método de difusão em ágar para a determinação da sensibilidade bacteriana a antibióticos. O ágar Mueller-Hinton (MHA) é o meio de cultura mais empregado e indicado porque não possui carga, facilita a difusão do antimicrobiano e não interfere na atividade antimicrobiana (GIVENTAL *et al.*, 1980; PIDDOCK, 1990; KONEMAN *et al.*, 1992).

A CIM de amoxicilina capaz de inibir o desenvolvimento de cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis está na faixa de 0,06 a 1,00 µg/mL (PHILIPS, 1991; KONEMAN *et al.*, 1992; GROPPPO, 1996; BAGLIE, 1998).

2.3 - *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos foram primeiramente observados por Pasteur e por Koch. Aproximadamente 30% das infecções causadas pelo *Staphylococcus aureus* são devidas à microbiota endógena (PERL & GOLUB, 1998).

O *Staphylococcus aureus* é parte integrante da microbiota normal humana (CARNEY, 1985), sendo sua sensibilidade à amoxicilina comprovada na literatura (PHILIPS, 1991; KONEMAN *et al.*, 1992).

O *Staphylococcus aureus* é também o principal agente infectante de feridas cirúrgicas (KONEMAN *et al.*, 1992), além de ser um patógeno importante nas infecções hospitalares e fazer parte da etiologia da endocardite infecciosa (McCARTNEY, 1992).

As infecções por *Staphylococcus aureus* apresentam as seguintes manifestações clínicas: furúnculo e antraz, impetigo bolhoso, infecção cutânea secundária, síndrome de pele escaldada estafilocócica e endocardite, entre outras (PRADO *et al.*, 2001).

A exposição de bactérias a antibióticos β-lactâmicos pode resultar na perda de um inibidor das autolisinas (enzimas autolíticas da parede celular). Essas bactérias são denominadas “tolerantes à penicilina” e foram isoladas cepas de estafilococos desse tipo em pacientes com infecções persistentes (TOMASZ, 1979).

De acordo com dados da literatura e vários trabalhos de pesquisa, a resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos tem se expandido muito nos últimos anos (ROMAN *et al.*, 1997; KAMIYA, 1997; PERL & GOLUB, 1998; FARIAS, 1997).

Um dos principais fatores que contribuem para a resistência microbiana, principalmente das cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes, é o uso intensivo de antimicrobianos de amplo espectro, especialmente em pacientes imunocomprometidos ou em idosos (KAMIYA, 1997).

2.4 – AMOXICILINA

A antibioticoterapia é um procedimento freqüente no tratamento de pacientes com infecções odontogênicas agudas com manifestação sistêmica, mas o risco/benefício dessa terapia deve ser considerado individualmente (KARLOWSKY *et al.*, 1993).

O emprego de antimicrobianos nas infecções bucais é indicado, mesmo de maneira empírica, quando não há tempo para a realização de testes de sensibilidade bacteriana. Entretanto, devem-se conhecer as bactérias geralmente envolvidas nessas infecções (SABISTON *et al.*, 1976).

As penicilinas são indicadas como drogas de primeira escolha nas infecções odontogênicas (WOODS, 1978), embora não seja incomum a presença de microrganismos resistentes às penicilinas em culturas de processos supurativos dentais (LABRIOLA, 1983).

A resistência bacteriana às penicilinas é explicada, em parte, pela ação da enzima beta-lactamase, mas, atualmente o uso de inibidores desta enzima, como o ácido clavulânico, permite neutralizar esse processo (RANG *et al.*, 2001).

Cerca de 7,2% dos pacientes tratados com penicilinas podem apresentar reações alérgicas (WOODS, 1978). Outros efeitos adversos incluem a alteração da microbiota intestinal (RANG *et al.*, 2001) e manifestações hemorrágicas devido a grandes doses, por via parenteral, que podem antagonizar a ligação do difosfato de adenosina aos receptores plaquetários (BABIÁK & RYBAK, 1986).

A amoxicilina é uma penicilina de amplo espectro composta por anel beta-lactâmico, anel tiazolidínico e pela cadeia lateral, responsável pela maior parte das suas características farmacodinâmicas e do seu espectro de ação (NEIDLE *et al.*, 1998).

O espectro de ação da amoxicilina é similar ao das penicilinas G e V, sendo, em relação a essas, menos ativa contra microrganismos gram-positivos anaeróbios, aeróbios e facultativos, e mais eficaz contra cocos e bacilos aeróbios gram-negativos (FONSECA, 1988; KARLOWSKY *et al.*, 1993).

O mecanismo de ação da amoxicilina e das demais penicilinas está relacionado à síntese e destruição do peptidoglicano, componente da parede celular da bactéria, induzindo a lise bacteriana. As penicilinas se ligam a várias proteínas da membrana celular bacteriana, ou proteínas de ligação da penicilina (PLPs), que são transpeptidases e carboxipeptidases as quais catalisam algumas das reações envolvidas na etapa terminal da síntese da parede celular (BIRNBAUM *et al.*, 1985).

Esquemas para profilaxia antibiótica da endocardite infecciosa são sugeridos pela *American Heart Association*, sendo a amoxicilina indicada atualmente em administração 1 hora antes do procedimento cirúrgico, em dose única de 2 g para a proteção do paciente (DAJANI *et al.*, 1994).

A amoxicilina é bem absorvida pela via oral, independente da presença ou não de alimentos. Sua taxa de ligação às proteínas plasmáticas (LPP) varia entre 17 e 20%. Possui boa distribuição por todo o organismo, sendo excretada pelos rins em sua forma ativa (CROYDON & SUTHERLAND, 1970; AMATO-NETO *et al.*, 1985; FONSECA, 1988; DAJANI *et al.*, 1994).

Foram obtidos níveis plasmáticos de 9,0; 14,5; 10,7 e 3,7 µg/mL dentro de 1, 2, 4 e 6 horas, respectivamente, após a administração oral de 40 mg/Kg de amoxicilina (DAJANI *et al.*, 1994).

O rim é o órgão de maior importância na excreção de medicamentos. No túbulo renal proximal, as penicilinas e os glicuronídeos são acrescentados, por secreção tubular ativa, ao filtrado glomerular. Este processo é bidirecional, mediado por carreador de membrana e não seletivo. Nos túbulos renais proximal e distal são reabsorvidas as formas não-ionizadas de ácidos e bases fracas (DAJANI *et al.*, 1994).

Os sistemas renal e intestinal de transporte de peptídeo constituem-se de dois transportadores de peptídeo homólogos, PEPT1 e PEPT2, que foram encontrados principalmente no intestino delgado e nos rins, respectivamente, sendo que a amoxicilina apresentou maior afinidade pelo PEPT2 (TERADA *et al.*, 1997).

A amilorida e o enalapril, fármacos que possuem alta afinidade por transportadores de peptídeos, podem provocar a diminuição da concentração sérica da amoxicilina de acordo com os estudos de WESTPHAL *et al.* (1995) e de SCHOENMAKERS *et al.* (1999), respectivamente.

2.5 - DICLOFENACO

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) constituem um grupo de fármacos com estrutura química variada, que geralmente exercem atividade analgésica, antipirética, uricosúrica, antiinflamatória, antitrombótica arterial e venosa (INSEL, 1990).

Segundo VOILLEY (2004), a administração dos AINEs, como aspirina, diclofenaco e flurbiprofeno, diminui a dor induzida pelo pH ácido do tecido inflamado, o que pode ser atribuído à inibição da atividade dos canais iônicos modulados por prótons presentes nos neurônios sensoriais. A ação direta e rápida desses AINEs nas correntes iônicas bloqueia imediatamente a ativação dos neurônios sensíveis à dor pelo estímulo ácido e pela acidose inflamatória. Em seguida, os AINEs, por sua ação nas COXs, limitam a produção de elementos inflamatórios e de dor. De modo geral, esses medicamentos previnem a sensibilização para dor inibindo a ação de genes codificadores dos canais de correntes iônicas ácido-sensíveis.

O diclofenaco sódico, um antiinflamatório não esteroidal derivado do grupo do ácido fenilacético (MORAN, 1990; FRANCO, 1995), inibe a ação das ciclooxigenases (COX), enzimas que catalisam a conversão do ácido aracdônico em endoperóxidos cíclicos instáveis intermediários, como as prostaglandinas e prostaciclina, que estão envolvidos no processo inflamatório e na sensibilização

das unidades dolorosas centrais e periféricas. Este AINE inibe também a quimiotaxia para polimorfonucleares para o local da agressão (INSEL, 1990; RANG *et al.*, 2001).

A toxicidade gástrica dos AINEs é o efeito adverso mais comum. Hemorragias gastrintestinais e úlceras pépticas são complicações mais freqüentes. Entre 15 a 25% dos pacientes que utilizam AINEs apresentam doença péptica. A ocorrência de úlcera associada é maior quando há histórico de doença péptica prévia, úlcera, concomitância com *Helicobacter pylori*, uso de anticoagulantes e de álcool (INSEL, 1990). Entretanto, os AINEs inibidores seletivos da COX-2 são agentes não-acídicos que causam menor número de complicações, especialmente afecções pépticas e coagulopatias (PORTENOY, 1989).

Cuidados especiais devem ser adotados por ocasião da prescrição do fármaco para hepatopatas, nefropatas, hipertensos, gestantes e pacientes com insuficiência cardíaca congestiva ou com história de reação alérgica aos AINEs (OMOIGUI, 1995).

Várias interações do diclofenaco com alimentos e medicamentos são descritas na literatura. A absorção intestinal do diclofenaco é reduzida com a ingestão de alimentos, leite e carvão ativado, sendo sua excreção urinária aumentada com alcalinizantes urinários (OMOIGUI, 1995).

A concentração plasmática do diclofenaco sódico aumenta quando da sua prescrição simultânea com a ciclosporina (MUELLER *et al.*, 1993). O diclofenaco sódico causa um déficit na excreção renal de ceftriaxona (MERLE-MELET *et al.*, 1992) e um aumento dos níveis séricos de lítio (FONSECA, 2001) durante a sua co-administração com essas drogas.

A administração de 2,5 mg/Kg de diclofenaco sódico em conjunto com 25 mg/Kg de amoxicilina, por via intragástrica, afetou negativamente a concentração sérica e tecidual do antimicrobiano em ratos (JUNQUEIRA, 2002). Da mesma forma, a administração concomitante de 25 mg/kg de amoxicilina por via oral e de 2,5 mg/kg de diclofenaco sódico por via intramuscular, em ratos, causou um decréscimo nos níveis séricos e teciduais do antimicrobiano (GROPPO *et al.*, 2004).

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi:

Estudar, em ratos, a influência do diclofenaco na absorção gastrointestinal, nos níveis séricos e na excreção renal da amoxicilina.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 – ANIMAIS

Foram utilizados 108 ratos (*Rattus norvegicus – albinus, Wistar*), machos, adultos jovens, com peso entre 150 e 200 g, *Specific Patogen Free* (S.P.F.), fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Os animais permaneceram cerca de duas semanas nas dependências do biotério de experimentação da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba para adaptação. Nesta fase de adaptação e durante a fase experimental, eles receberam ração balanceada comercial (Purina) e água *ad libitum*.

4.2 – FÁRMACOS

Foram utilizadas: suspensão de amoxicilina triidratada (*Sigma Co.*) na concentração de 25 mg/mL e solução de diclofenaco sódico (Voltaren[®] – Novartis Biociências) na concentração de 2,5 mg/mL.

4.3 – ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS

Os animais foram separados em 12 grupos (n=9), que receberam os seguintes tratamentos, após serem mantidos em jejum por 1 hora:

- Por administração intragástrica (*p.o.*):
 - a) Grupo S1 - amoxicilina 25 mg/Kg
 - b) Grupo S2 - diclofenaco sódico 2,5 mg/Kg + amoxicilina 25 mg/Kg
 - c) Grupo S3 - 1,0 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%
 - d) Grupo R1 - amoxicilina 25 mg/Kg
 - e) Grupo R2 - diclofenaco sódico 2,5 mg/Kg + amoxicilina 25 mg/Kg
 - f) Grupo R3 - 1,0 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%

- Por administração intraluminal:
 - g) Grupo G1 - amoxicilina 25 mg/Kg
 - h) Grupo G2 - diclofenaco sódico 2,5 mg/Kg + amoxicilina 25 mg/Kg
 - i) Grupo G3 - 1,0 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%
 - j) Grupo D1 - amoxicilina 25 mg/Kg
 - k) Grupo D2 - diclofenaco sódico 2,5 mg/Kg + amoxicilina 25 mg/Kg
 - l) Grupo D3 - 1,0 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%

As drogas foram administradas em dose única, com o auxílio de uma seringa de 1 mL com agulha curva (*Arkansas*) 70x15 mm para administração intragástrica e agulha hipodérmica descartável (*RYMCO*) 13x0,45 mm para injeção intraluminal nos estômagos (animais dos grupos G1, G2 e G3) e intestinos (animais dos grupos D1, D2 e D3) previamente ligados e retirados cirurgicamente.

4.4 - OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 10^8 u.f.c./ mL

Para a realização do método microbiológico, com auxílio de uma alça de platina esterilizada, foi colhida uma alçada de colônias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 cultivadas em TSA inclinado (anexo 1, figura 1). A alçada foi transferida para tubo de ensaio contendo 10 mL de BHI, incubada e mantida em estufa de cultura a 37°C por 6 horas, para atingir a fase de crescimento exponencial. Após a incubação, 1 mL da amostra foi retirado e diluído em solução salina de cloreto de sódio a 0,9% até a obtenção de suspensão bacteriana com densidade óptica de 60% (equivalente a 10^{10} u.f.c./mL). A densidade óptica foi controlada com auxílio de um espectrofotômetro (*Spectronic 20[®]* - *Bausch & Lomb*) previamente zerado com BHI e ajustado para comprimento de onda de 800 nm. A seguir, foi transferido 1,0 mL do inóculo ajustado para 99 mL de MHA (densidade final equivalente a 10^8 u.f.c./mL), com temperatura de 45°C. O ágar líquido inoculado, após agitação, foi dispensado em placas de Petri (22 mL para cada placa). As placas de Petri foram mantidas em repouso por 15 minutos para solidificação do meio de cultura à temperatura ambiente. A seguir foram colocados os materiais em teste na superfície do meio de cultura solidificado.

4.5 - DISCOS

Para os ensaios da absorção gastrointestinal, das concentrações séricas e urinárias da amoxicilina e do estabelecimento da curva de regressão, foram utilizados discos de papel filtro (*blank*) comerciais (Cecon Ind. Bras.), de 6,2mm de diâmetro, esterilizados em autoclave a 120°C por 15 minutos.

4.6 – MEIOS DE CULTURA

A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi mantida em ágar triptona soja (TSA – Oxoid Co), repicada a cada sete dias e também 24 horas antes de ser utilizada.

O meio de cultura BHI foi utilizado durante a fase de crescimento exponencial das colônias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para a obtenção da concentração de 10^8 u.f.c./mL.

Para o teste de sensibilidade bacteriana, foi utilizado o ágar Mueller-Hinton (MHA – Oxoid Co), distribuído (22 mL) em placas de Petri de vidro, previamente esterilizadas, de 150 x 20mm. Neste meio de cultura foi depositada uma suspensão bacteriana com 10^{10} u.f.c./mL.

4.7 – MICROORGANISMO

Foi utilizado o microrganismo *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923, reativado a partir de amostras armazenadas a -70°C . Sua viabilidade foi constatada pelo cultivo em ágar tripticaseína soja (TSA – Oxoid Co.) e sua identificação confirmada pelo método de coloração de Gram (KONEMAN *et al*, 1992).

4.8 – OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO

Uma curva padrão foi elaborada para se relacionar os diâmetros dos halos produzidos pelas amostras e a provável concentração do antimicrobiano em estudo (anexo 2, figura 2). Foram utilizados discos de papel esterilizados contendo

as seguintes concentrações em µg do antimicrobiano: 0,02, 0,035, 0,070, 0,1562; 0,3125; 0,625; 1,250; 2,50; 5,0; 10,0. Após secagem em estufa a 37⁰C por uma hora, estes discos foram dispostos em placas contendo MHA inoculado a 10⁸ ufc/mL de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Em cada placa foram dispostos quatro discos, sendo utilizadas três placas para cada concentração. Desta forma, foram obtidos três valores de halo de inibição para cada concentração em estudo.

As placas foram levadas à estufa a 37⁰C por 18 horas e, logo após, os halos medidos com paquímetro e as médias obtidas inseridas em um programa de computador (*Excel for Windows*[®] 7.0 – *Microsoft Co.*) que forneceu uma curva, com valor de R-quadrado (R²) e a sua equação (diâmetro de halo de inibição em função da concentração que o originou).

4.9 – COLETA E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Todos os animais, exceto os dos grupos R1, R2 e R3, foram anestesiados com uma combinação de quetamina (90 mg/kg IM) e xilazina (10 mg/kg IM). Após anestesia geral, nos tempos de 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos depois da administração das drogas, foi seccionado o plexo carotídeo dos animais pertencentes aos grupos S1, S2 e S3, sendo utilizado um animal de cada grupo para cada tempo e colhidas amostras de 5 mL de sangue em tubos plásticos para centrífuga previamente autoclavados. Estas amostras foram submetidas à retração do coágulo em banho-maria a 37⁰C. A seguir, foram centrifugadas durante 10 min a 3500rpm e foi retirada uma alíquota de 30µL do soro sangüíneo resultante de cada amostra.

Foram ligados, em suas extremidades, os estômagos dos animais dos grupos G1, G2 e G3 e os duodenos dos animais dos grupos D1, D2 e D3. Em seguida, esses órgãos foram retirados cirurgicamente e colocados separadamente em recipientes contendo 5 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% com pH 7,4. Após a administração intraluminal dos medicamentos, as amostras foram deixadas em estufa a 37°C (ENDO *et al.*, 2001) durante 6 horas, com aeração constante. Foram retiradas alíquotas de 20 µL das amostras nos tempos de 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos após a administração das drogas, sendo utilizada a amostra de um animal de cada grupo para cada tempo.

Através do método do reflexo de esvaziamento sob massagem (KRAUS, 1980) foram colhidas, em *eppendorfs*, amostras de urina dos animais pertencentes aos grupos R1, R2 e R3 nos tempos de 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos após a administração das drogas, sendo utilizado um animal de cada grupo para cada tempo. A seguir, uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi coletada.

As amostras provenientes de cada animal foram colocadas em 3 discos de papel de filtro de 6,25 mm esterilizados. Os discos foram colocados em estufa a 37°C, por 1 hora, para secagem. Após a secagem, foram posicionados em placas contendo MHA inoculadas com 10⁸ ufc de *S. aureus* ATCC 25923, como previamente descrito, e submetidos a dezoito horas de incubação em estufa a 37°C. Depois da incubação, os halos de inibição formados foram medidos com paquímetro e seus valores anotados para análise posterior (anexo 3, figura 3).

4.10 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores das concentrações séricas e teciduais calculados através da equação da curva de regressão foram submetidos ao teste de Mann-Whitney, em programa estatístico informatizado (*Bioestat for Windows*[®], versão 1.0 - *Microsoft Co.*).

5. RESULTADOS

As médias obtidas dos diâmetros dos halos de inibição proporcionados pelas diferentes concentrações de amoxicilina, utilizadas para a obtenção da curva de regressão, são observadas na tabela 1.

Tabela 1. Diâmetros, em mm, dos halos de inibição correlacionados com as quantidades de amoxicilina, em μg .

QUANTIDADE DE AMOXICILINA	MEDIDA 1	MEDIDA 2	MEDIDA 3	MÉDIA
10,0000	45,0	46,0	46,0	45,67
5,00000	45,0	45,0	46,0	45,33
2,50000	41,0	42,0	42,0	41,67
1,25000	39,0	39,0	38,5	38,83
0,62500	36,0	36,5	37,0	36,50
0,31250	33,5	34,0	35,0	34,17
0,15620	33,5	31,0	31,0	31,83
0,07000	30,0	29,0	28,0	29,00
0,03500	27,0	26,0	27,0	26,67
0,02000	22,0	23,0	22,0	22,33

O gráfico 1 mostra a curva padrão ou de regressão considerando as médias de diâmetros dos halos de inibição e o logaritmo das concentrações de amoxicilina, sendo estabelecidos sua equação matemática e o coeficiente de correlação (R^2).

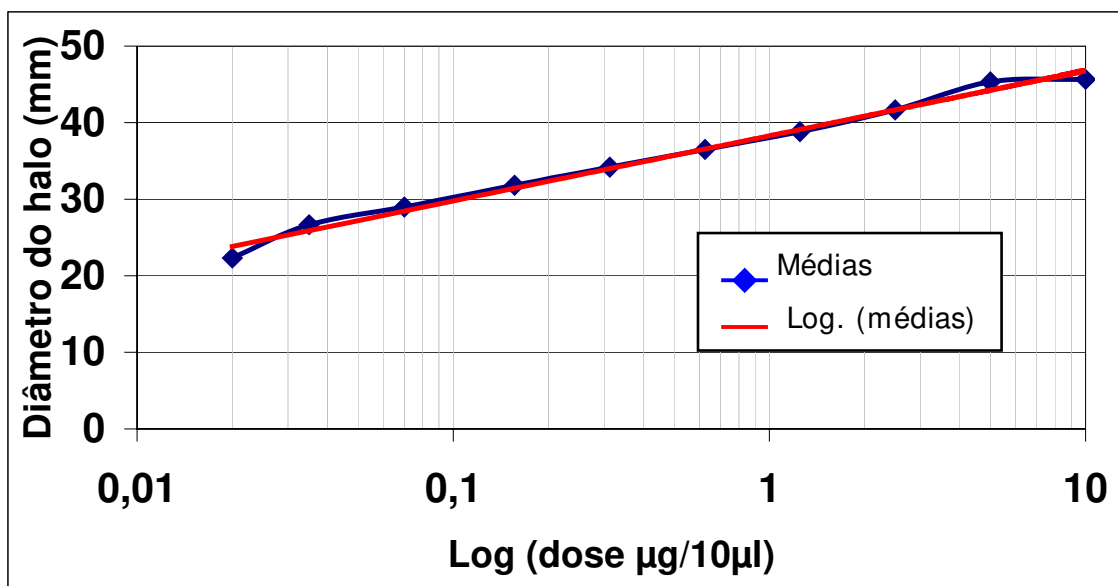


Gráfico 1. Curva padrão ou de regressão de amoxicilina obtida pelo método microbiológico.

Na equação $y = 3,6964\ln(x) + 38,291$: y = diâmetro do halo de inibição (mm) e x = quantidade de amoxicilina (μg). O coeficiente de linearidade (R^2) foi 0,988. Esta relação é válida para diâmetros de halo de inibição entre 22,33 e 45,67mm.

O gráfico 2 apresenta as médias da quantidade de amoxicilina que atravessou a mucosa estomacal dos animais que receberam apenas amoxicilina (grupo G1) e dos animais que receberam simultaneamente amoxicilina e diclofenaco (grupo G2), em função do tempo.

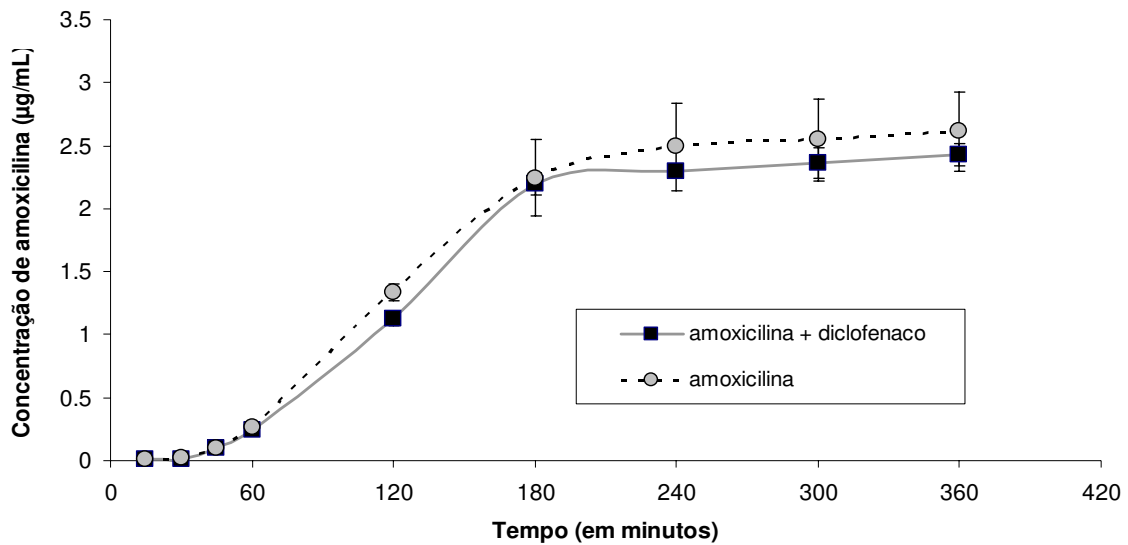


Gráfico 2. Representação gráfica dos valores médios da quantidade de amoxicilina, em $\mu\text{g/mL}$, que atravessou a mucosa gástrica dos animais dos grupos G1 e G2, em função do tempo.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (Mann-Whitney, $p > 0,05$) entre os dois grupos em quaisquer dos tempos analisados.

O gráfico 3 apresenta os valores médios da quantidade de amoxicilina que atravessou a mucosa intestinal dos animais que receberam apenas amoxicilina (grupo D1) e dos animais que receberam simultaneamente amoxicilina e diclofenaco (grupo D2), em função do tempo.

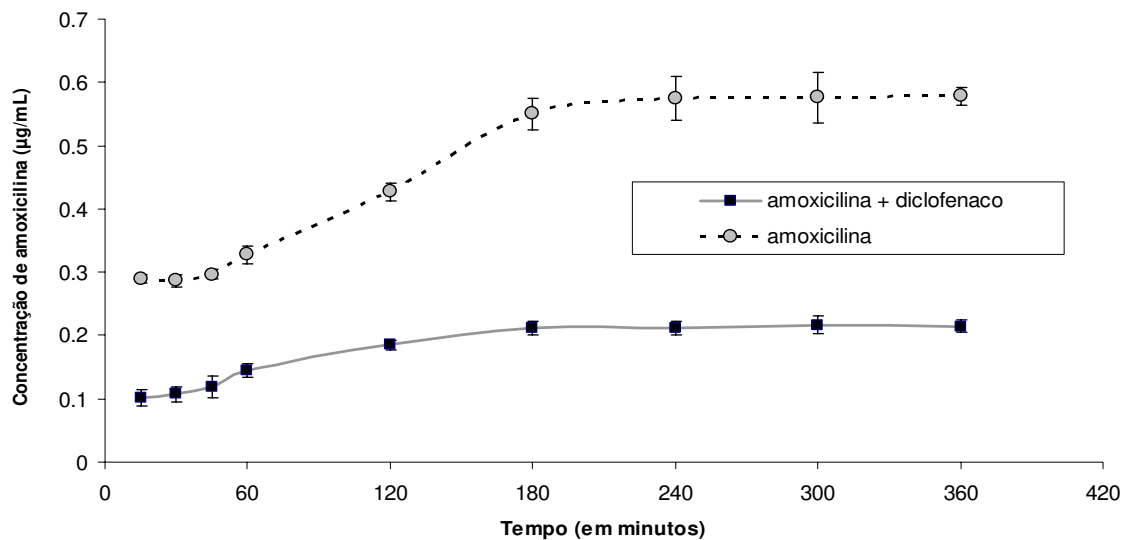


Gráfico 3. Representação gráfica dos valores médios da quantidade de amoxicilina, em µg/mL, que atravessou a mucosa duodenal dos animais dos grupos D1 e D2, em função do tempo.

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes (Mann-Whitney, $p < 0,01$), entre os grupos D1 e D2, em todos os períodos estudados, sendo que a combinação com o diclofenaco sódico causou um decréscimo nas concentrações de amoxicilina em todos os tempos de estudo.

O gráfico 4 apresenta as médias da concentração sérica, em $\mu\text{g/mL}$, de amoxicilina dos animais que receberam apenas amoxicilina (grupo S1) e dos animais que receberam simultaneamente amoxicilina e diclofenaco (grupo S2), em função do tempo.

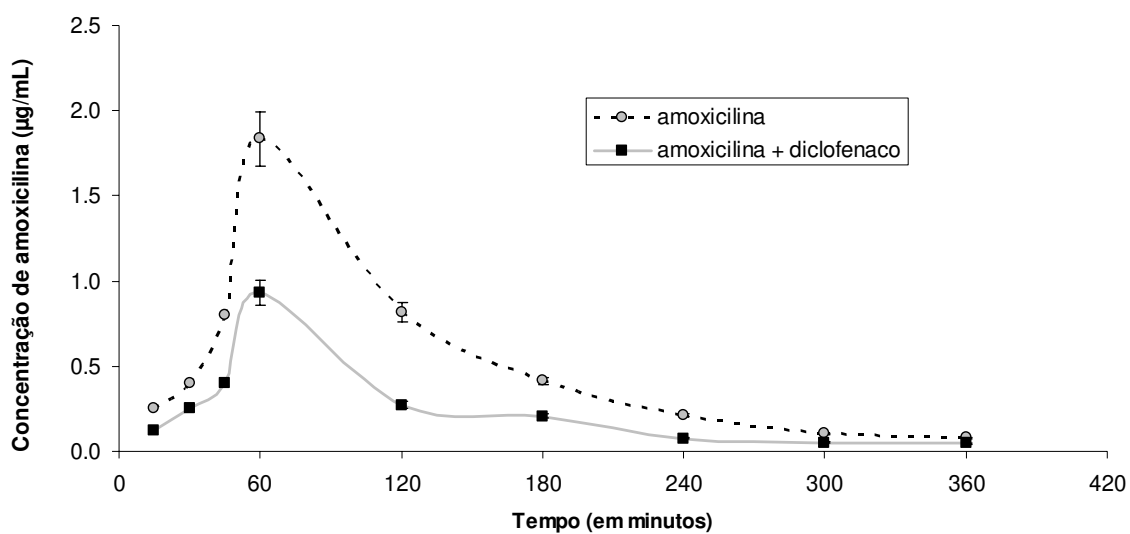


Gráfico 4. Representação gráfica, em função do tempo, dos valores médios da concentração sérica, em $\mu\text{g/mL}$, de amoxicilina obtidos dos animais dos grupos S1 e S2.

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes (Mann-Whitney, $p < 0,01$) entre os grupos em todos os períodos estudados, sendo que a combinação com o diclofenaco sódico causou um decréscimo nas concentrações séricas de amoxicilina em todos os tempos de estudo.

O gráfico 5 mostra os valores médios da concentração urinária, em $\mu\text{g/mL}$, de amoxicilina obtidos dos animais que receberam apenas amoxicilina (grupo R1) e dos animais que receberam simultaneamente amoxicilina e diclofenaco (grupo R2), em função do tempo.

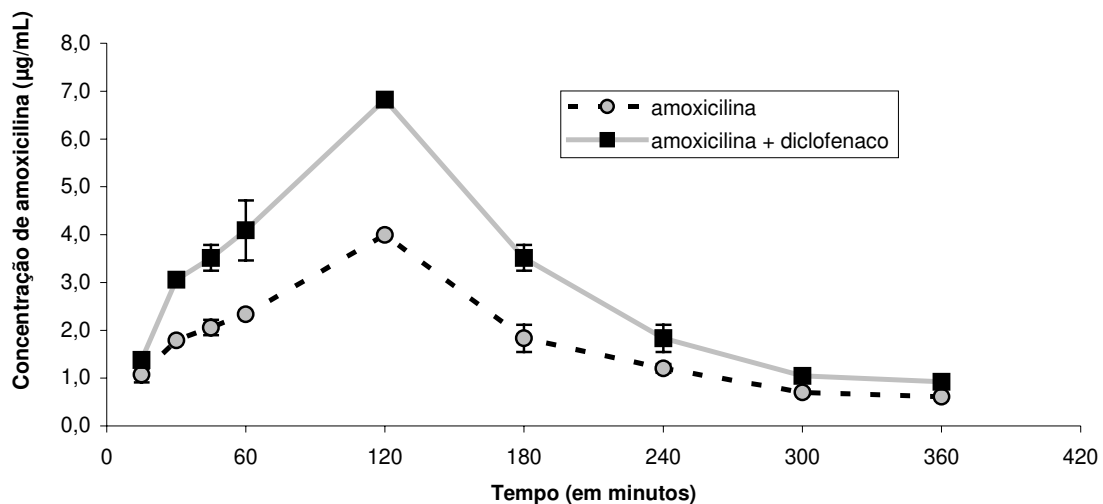


Gráfico 5. Médias, em função do tempo, da concentração urinária, em $\mu\text{g/mL}$, de amoxicilina obtidas dos animais dos grupos R1 e R2.

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes (Mann-Whitney, $p < 0,01$) entre os grupos em todos os períodos estudados, com exceção do tempo de 15 minutos, sendo que a combinação com o diclofenaco sódico causou um aumento nas concentrações urinárias de amoxicilina em todos os tempos de estudo.

6. DISCUSSÃO

Embora existam várias metodologias para a determinação da concentração de antimicrobianos, o método microbiológico vem sendo muito utilizado para a quantificação da amoxicilina (BRITISH PHARMACOPOEIA, 1988; US PHARMACOPOEIA, 1990; DEVANI *et al.*, 1992; KRAUWINKEL *et al.*, 1993). Este método é comparável, em termos de precisão, aos ensaios com equipamentos tidos como mais precisos, tal como a CLAE (HSU & HSU, 1992; MOORE *et al.*, 1996). Desta forma, a utilização do método microbiológico proporcionou mensurações com precisão suficiente para o propósito deste trabalho, assim como em estudos prévios (BAGLIE *et al.*, 2000; GROPPPO *et al.*, 2000).

Um dos principais aspectos necessários ao sucesso do uso do método microbiológico é o conhecimento da sensibilidade do microrganismo utilizado (GROPPPO *et al.*, 2000). No presente estudo, foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, o qual já teve sua sensibilidade à amoxicilina comprovada pela literatura (PHILIPS, 1991; KONEMAN *et al.*, 1992; KONEMAN *et al.*, 1994; BAGLIE, 1998; BAGLIE *et al.*, 2000; GROPPPO *et al.*, 2000).

GROPPPO *et al.* (2004) verificaram que o uso concomitante de diclofenaco sódico (2,5 mg/kg/IM) com amoxicilina (50 mg/kg/VO), em ratos, resultou num decréscimo de aproximadamente oito vezes nas concentrações sérica e tecidual da amoxicilina. Entretanto, estes autores não estudaram os possíveis parâmetros farmacocinéticos desta interação.

A interferência do diclofenaco sódico nos níveis séricos da amoxicilina poderia comprometer a sua eficácia, uma vez que a atividade antimicrobiana da amoxicilina depende essencialmente do período de tempo no qual as suas

concentrações séricas são mantidas além da concentração inibitória mínima para um determinado patógeno. Assim, quaisquer fatores que provoquem a diminuição deste parâmetro poderiam levar ao insucesso da terapia antimicrobiana (PALLASCH, 1996).

Vários estudos têm demonstrado a interferência do diclofenaco sódico na biodisponibilidade de diferentes fármacos (MERLE-MELET *et al.*, 1992; MUELLER *et al.*, 1993). Esses estudos avaliaram apenas a dosagem plasmática dos fármacos, não buscando, de uma forma mais detalhada, em qual etapa farmacocinética a interferência do diclofenaco sódico foi mais evidente.

Os modelos experimentais que utilizam técnicas de perfusão gastrointestinal podem ser válidos para avaliação do comportamento farmacocinético de antimicrobianos (HARCOUËT *et al.*, 1997; ENDO *et al.* 2001). Baseado neste princípio, no presente estudo, foi utilizado o modelo *in vitro* proposto por ENDO *et al.* (2001), já previamente validado, o qual permitiu a dosagem da absorção gástrica e duodenal da amoxicilina.

O mecanismo de absorção da amoxicilina é saturável, o que tem implicações quando altas doses orais de amoxicilina são utilizadas (CHULAVATNATOL *et al.*, 1994). Essa característica farmacocinética da amoxicilina pode explicar a redução na taxa de absorção gástrica *in vitro* verificada no presente trabalho após a quarta hora da administração oral de 25 mg/kg de amoxicilina. Esta dose seria o equivalente à administração de aproximadamente 2 g de amoxicilina em um ser humano de 70 kg.

Apesar de o diclofenaco sódico apresentar alta ligação às proteínas plasmáticas (cerca de 99%), a amoxicilina apresenta uma ligação de apenas 17 a

20% (HARDMAN & LIMBIRD, 1996). Desta forma, este fator muito provavelmente não influenciou na redução da concentração sérica do antimicrobiano verificada.

O diclofenaco sódico é rápida e extensamente biotransformado no fígado (MENDES *et al.*, 1994). A indução enzimática poderia ser apontada como sendo responsável pela baixa concentração sérica da amoxicilina. Entretanto, a amoxicilina é metabolizada em ácido penicilínico numa extensão pequena. Cerca de 60% da dose oral de amoxicilina é excretada “in natura” pela urina após 6 horas, por filtração glomerular e secreção tubular (REYNOLDS, 1996). Portanto, a redução sérica da amoxicilina observada quando associada ao diclofenaco sódico provavelmente não ocorreu devido à indução enzimática proporcionada por este fármaco.

A concentração sérica da amoxicilina quando associada ao diclofenaco sódico foi de 0,46 µg/mL 2 horas após a administração dos fármacos, o que corrobora com os resultados encontrados por JUNQUEIRA (2002).

Após 6 horas da sua administração, a amoxicilina apresentou uma concentração sérica de apenas 0,21 µg/mL. Como a CIM para a amoxicilina capaz de inibir o desenvolvimento de cepas de *S. aureus* sensíveis está entre 0,06 a 1,0 µg/mL (PHILIPS, 1991; KONEMAN *et al.*, 1992), seria de se esperar uma boa performance do fármaco frente a este patógeno, *in vivo*, durante este período. Todavia, em processos infecciosos volumosos onde a vascularização é limitada ou ocorre diminuição do fluxo sanguíneo local, a concentração dos antimicrobianos é bastante inferior àquela encontrada no soro (PALLASCH, 1996). Portanto, a eficácia clínica da amoxicilina poderia ser prejudicada pela sua associação ao diclofenaco sódico, principalmente se considerarmos que a sua eficácia está diretamente relacionada com o tempo durante o qual a concentração sérica do

antimicrobiano é maior do que a sua CIM frente ao patógeno no local da infecção (BARZA, 1978). Além disso, por ser uma droga não-lipofílica, a amoxicilina encontra-se confinada no fluido extracelular, que constitui aproximadamente 20% do tecido corporal, apresentando níveis teciduais totais menores que os níveis séricos (CARS, 1990).

Nenhuma diferença significativa foi observada na absorção gástrica de amoxicilina pela co-administração do diclofenaco, provavelmente porque após a administração intragástrica, sua absorção ocorre principalmente por difusão simples. Essa absorção poderia ser aumentada pela alcalinização ou acidificação do meio, uma vez que a amoxicilina tem caráter anfotérico, isto é, contém uma amina (-NH₂) e um grupamento ácido (-COOH). A partir do sangue, a difusão da amoxicilina para o tecido estomacal é mínima (ENDO *et al.*, 2001).

Outros estudos mostraram que a amoxicilina é menos ionizada em pH ácido e em condição alcalina a mesma tem seu coeficiente de partição lipídio-água reduzido, sendo sua penetração tecidual também reduzida (McNULTY & WISE, 1986; CARDACI *et al.*, 1995), embora nenhuma relação entre o pH do suco gástrico e os níveis séricos de amoxicilina tenha sido encontrada por CARDACI *et al.* (1995). No presente trabalho, o modelo *in vitro* empregado não permitiu ao diclofenaco sódico reduzir os níveis de prostaglandina E₂ e, conseqüentemente, reduzir o muco estomacal e aumentar a acidez gástrica (MINTA & WILLIAMS, 1985; FRIMAN *et al.*, 1986; ABRAMSON *et al.*, 1990).

GROPPO *et al.* (2004) administrando 25 mg/kg de amoxicilina por via oral associada a 2,5 mg/kg de diclofenaco sódico por via intramuscular, em ratos, obteve resultados semelhantes aos do presente trabalho em relação aos níveis séricos do antimicrobiano. Com base nestes achados, a interação entre os

dois fármacos na fase de absorção gástrica teria um papel secundário na diminuição da concentração sérica da amoxicilina, uma vez que as drogas foram administradas por diferentes vias.

No presente estudo, a administração simultânea do diclofenaco sódico com a amoxicilina causou uma redução estatisticamente significativa na absorção intestinal do antimicrobiano. Desta forma, o AINE pode ter sido o responsável pela inibição da absorção intestinal do antimicrobiano.

A absorção intestinal de amoxicilina tem um componente de difusão passiva significativa (MARGARIT *et al.* 1991). Além disso, a absorção desse antimicrobiano também tem sido relacionada com o sistema transportador de di, tri ou oligopeptídeos, o qual está presente principalmente na mucosa intestinal e no fígado (TERADA *et al.*, 1997).

Estudos têm demonstrado que fármacos que possuem uma alta afinidade por transportadores de peptídeos, como a amilorida (WESTPHAL *et al.*, 1995) e o enalapril (SCHOENMAKERS *et al.*, 1999), podem provocar grande decréscimo na concentração sérica da amoxicilina. Entretanto, o sistema transportador de peptídeos pode não estar relacionado à menor absorção intestinal da amoxicilina quando administrada com o diclofenaco, uma vez que os transportadores de peptídeos não estão usualmente associados com a absorção do diclofenaco. A absorção do diclofenaco está relacionada principalmente por sua excreção biliar e reabsorção intestinal (PERIS-RIBERA *et al.*, 1991).

Recentemente, dois transportadores de oligopeptídeos distintos, mas homólogos (PEPT1 e PEPT2) foram identificados por uma técnica de clonagem de cDNA em ratos, coelhos e humanos (TERADA *et al.*, 1997; VAN AUBEL *et al.*,

2000; GANAPATHY *et al.*, 1995). O mRNA de PEPT1 foi encontrado tanto no intestino delgado como nos rins de ratos, enquanto que o mRNA de PEPT2 foi encontrado abundantemente nos rins, mas não no intestino delgado. Entretanto, foram encontrados tanto PEPT1 como PEPT2 nos rins, sugerindo que os dois transportadores contribuem para a reabsorção tubular de oligopeptídeos.

Estes estudos revelaram também que os PEPT1 e PEPT2 de ratos têm diferentes características não somente em relação a sua afinidade por dipeptídeos endógenos, mas também no reconhecimento de várias drogas relacionadas aos peptídeos. TERADA *et al.* (1997) demonstraram que a amoxicilina possui alta afinidade pelo PEPT2, o que sugere a importância desse transportador na reabsorção tubular do antimicrobiano.

Um aumento significativo na meia-vida de eliminação da ceftriaxona em pacientes utilizando o fármaco de forma associada ao diclofenaco foi previamente relatado (MERLE-MELET *et al.*, 1992). O diclofenaco causou um significativo aumento na excreção biliar de ceftriaxona, mas não o suficiente para compensar o significativo déficit da excreção urinária.

Por meio da quantificação da amoxicilina urinária buscou-se, no presente estudo, avaliar a influência do diclofenaco sódico sobre a eliminação renal do antimicrobiano. A administração concomitante do diclofenaco sódico com a amoxicilina acelerou a excreção renal do antimicrobiano, diminuindo suas concentrações séricas.

A análise de urina proveniente de indivíduos normais que receberam diclofenaco por via oral demonstrou que o diclofenaco e seus metabólitos excretados na urina representam aproximadamente 31% da dose oral do

fármaco (SAWCHUK *et al.* 1995). Portanto, apesar de não haver relatos na literatura sobre o envolvimento dos transportadores de peptídeos na absorção e na secreção do diclofenaco, seus metabólitos ativos podem ter sido os responsáveis pelo aumento na eliminação renal de amoxicilina observada no presente estudo.

Desta forma, pode-se sugerir uma possível interação dos metabólitos do diclofenaco como o principal mecanismo responsável pela excreção renal da amoxicilina, a reabsorção de peptidomiméticos nos rins. Portanto, metabólitos do diclofenaco como o 4'-hidroxiclofenaco e outros produtos do seu metabolismo, associados ou não ao próprio diclofenaco sódico *in natura* e excretados na urina, poderiam ter aumentado a eliminação urinária de amoxicilina através da inibição da sua reabsorção renal ou, mais especificamente, por inibir os transportadores renais de peptídeos (PEPT1 e PEPT2) responsáveis pela reabsorção renal do antimicrobiano.

Segundo GAUNT (1977), vários experimentos clínicos têm mostrado a efetividade de testes farmacológicos em animais. Portanto, clinicamente, o presente trabalho estimula a realização de novas pesquisas com o objetivo de se averiguar os possíveis mecanismos destas interações farmacocinéticas entre a amoxicilina e o diclofenaco sódico em humanos, proporcionando uma segurança maior no tratamento com o antimicrobiano.

7. CONCLUSÕES

Dentro das condições metodológicas em que esse trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

- O diclofenaco sódico não afetou a absorção gástrica da amoxicilina. Entretanto, a absorção intestinal foi significativamente reduzida;
- O diclofenaco sódico diminuiu significativamente as concentrações séricas da amoxicilina;
- O diclofenaco sódico aumentou significativamente a excreção renal da amoxicilina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramson SB, Kieran O, Lee M. Therapy and mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and pain management, acupuncture, and rehabilitation. ***Curr. Opin. Rheumatol.*** 1990; 2(3): 473-80.

Amato-Neto V, Baldey JLS. ***Antibióticos na prática médica.*** 3. ed. São Paulo: Sarvier; 1985.

Babiak LM, Rybak MJ. Hematological effects associated with betalactam use. ***Drug. Intell. Clin. Pharm.*** 1986; 20(11): 833-6.

Baglie S. ***Biodisponibilidade da amoxicilina. Estudo ex vivo, em ratos*** [Dissertação Mestrado]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 1998.

Baglie S, Groppo FC, Mattos-Filho TR. Tissue pharmacokinetics of amoxicillin. An experimental design in rats. ***Braz. J. Infect. Dis.*** 2000; 4(4): 197-203.

Balows A. ***Current techniques for susceptibility testing.*** Springfield: C.C. Thomas; 1974. 3-5. Apud PIDDOCK, L.J.V. Op. cit. Ref. 66.

Barza M. A critique of animal models in antibiotic research. ***Scand. J. Infect. Dis. Suppl.*** 1978; 14: 109-17.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. ***Am. J. Clin. Path.*** 1966; 45(4): 493-6.

Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, Macdonald JS. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. **Am. J. Med.** 1985; 78(6A): 3-21.

Bondi, A. **Am J Med Sci.** Routine method for rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. Philadelphia; 1947; 213: 221-5. *Apud* Piddock LJV. Op. cit. Ref. 66.

British Pharmacopoeia. **Her majesty's stationary office.** 1988; 1: 31-2.

Cardaci G, Lambert JR, King RG, Onishi N, Midolo P. Reduced Amoxicillin Uptake into Human Gastric Mucosa when Gastric Juice pH Is High. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 1995; Sept: 2084–7.

Carney DN. Bacteremia due to *Staphylococcus aureus* in patients with cancer: report on 45 cases and a review of the literature. **Rev. Infect. Dis.** 1985; 4(1): 1-12.

Cars O. Pharmacokinetics of antibiotics in tissues and tissue fluids: a review. **Scand. J. Infect. Dis. Suppl.** 1990; 74: 23-33.

Charles BG, Chulavatnatol S. Sample analysis of amoxicillin in plasma by high performance liquid chromatography with internal standardization and ultraviolet detection. **Biom. Chromat.** 1993; 7: 204-7.

Chulavatnatol S, Charles BG. Determination of dose dependent absorption of amoxicillin from urinary excretion data in healthy subjects. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 1994; 38(3): 274-7.

Croydon EAP, Sutherland R. Alfa-amino-p-hydroxybenzyl-penicillin (BRL 2333), a new semi synthetic penicillin: absorption and excretion in man. ***Antimicrob. Agents Chemother.*** 1970; 10: 427-30.

Dajani AS, Bawdon RE, Berry MC. Oral amoxicillin as prophylaxis for endocarditis: what is the optimal dose? ***Clin. Inf. Dis.*** 1994; 18(2): 157-60.

Dalhoff A, Ullmann U. Correlation between pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy of antibacterial agents in animal models. ***Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*** 1990; 9(7): 479-87.

Devani MB, Patel IT, Patel TM. Spectrophotometric determination of amoxicillin and its dosage forms. ***J. Pharm. Biomed. Anal.*** 1992; 10(5): 355-8.

Endo H, Yoshida H, Ohmi N, Higuchi S. Effects of lansoprazole, clarithromycin and pH gradient on uptake of [¹⁴C]amoxycillin into rat gastric tissue. ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*** 2001; 47(4): 405-10.

Farias WW. Sensitivity pattern of 117 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from 12 hospitals. ***Rev. Assoc. Med. Bras.*** 1997; 43(3): 199-204.

Ferreira SH, Moncada S, Vane JR. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. ***Nature.*** 1971; 231(25): 237-9.

Ferreira SH. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. ***Nature.*** 1972; 240(102): 200-3.

Fonseca AL. ***Antibióticos na clínica diária.*** 3.ed. Rio de Janeiro: Epume; 1988.

Fonseca AL. ***Interações medicamentosas***. 3. ed. Rio de Janeiro: Epub; 2001.

Franco LM. ***Determinação de bioequivalência de diferentes formulações de diclofenaco de potássio*** [Dissertação Mestrado]. Campinas: UNICAMP; 1995.

Friman C, Johnston C, Chew C, Davis P. Effect of diclofenac sodium, tolfenamic acid and indomethacin on the production of superoxid induced by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in normal human polymorphonuclear leucocytes. ***Scand. J. Rheumatol.*** 1986; 15(1): 41-6.

Ganapathy M, Brandsch M, Prasad P, Ganapathy V, Leibach F. Differential Recognition of Beta-Lactam Antibiotics by Intestinal and Renal Peptide Transporters, PEPT 1 and PEPT 2. ***The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*** 1995; 270(43): 25672-7.

Gaunt R. Animal models in drug development: historical aspects. ***Oncology.*** 1977; 34(3): 94-5.

Geigy. ***Voltaren prescribing information***. Ardsley. July, 1988.

Givental NI, Ved'mina EA, Bogdanova LF, Vlasova V. Standardization of the methods for determining microorganism sensitivity to antibiotics. Semiquantitative and quantitative evaluation of the results of the diffusion test. ***Antibiotiki.*** 1980; 25(6): 420-4.

Goodman LS, Gilman A. ***The Pharmacological Basis of Therapeutics***. 9. ed. New York: Pergamon Press Inc.; 1996.

Grosso FC. *Influência da evolução do tecido granulomatoso sobre a biodisponibilidade da amoxicilina. Estudo ex vivo, em ratos* [Tese Doutorado]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 1996.

Grosso FC, Mattos-Filho TR, Del-Fiol FS. Bioassay of amoxicillin in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 2000; 23(9): 1033-5.

Grosso FC *et al.* Effect of sodium diclofenac on serum and tissue concentration of amoxicillin and on staphylococcal infection. *Biol. Pharm. Bull.* 2004; 27(1): 52-5.

Harcouët L, Lebrech D, Rozé C, Carbon C, Farinotti R. Increased Intestinal Absorption of Cefixime by Nifedipine in the Rat Intestinal Perfusion Model: Evidence for a Neural Regulation, *JPET.* 1997; 281(2): 738-45.

Hardman JG, Limbird LE. (ed.). *Goodman & Gilman – The Pharmacological Basis of Therapeutics.* Vol. 9, New York: McGraw-Hill Co.; 1996.

Hsu MC, Hsu PW. High-performance liquid chromatographic method for potency determination of amoxicillin in commercial preparations and for stability studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992; 36(6): 1276-79.

Insel PA. Analgesic-antipyretics and antiinflammatory agents; drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout. in: Gilman AF, Rall TW, Nies AS, Taylor P. *The pharmacological basis of therapeutics.* Pergamon Press; 1990.

Junqueira MS. *Influência de antiinflamatórios sobre a concentração sérica e tecidual da amoxicilina. Estudo ex vivo, em ratos* [Dissertação Mestrado]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2002.

Kamiya Y. Experiences and studies on antimicrobial resistance in Japan: useful lessons for developing countries. *East Afr. Med. J.* 1997; 74(3): 174-6.

Karlowsky J, Ferguson J, Zhanel G. A review of commonly prescribed oral antibiotics in general dentistry. *J. Can. Dent. Ass.* 1993; 59(3): 292-4.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr. WC. *Introduction to diagnostic microbiology*. 2.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1992.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr. WC. (ed.) *Introduction to diagnostic microbiology*. Vol. 4, Philadelphia: J. B. Lippincott Company; 1994.

Korolkovas A. *Análise farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara; 1988.

Kraus AL. *Research bi methodology, in The Laboratory Rat*. Vol. II. New York: Academic Press; 1980.

Krauwinkel WJ, Kamermans-Volkers NJ, Zijtveld J. Determination of amoxicillin in human plasma by high-performance liquid chromatography and solid phase extraction. *J. Chromatography A*. 1993; 617(2): 334-8.

Labriola JD, Mascaro J, Alpert B. The microbiologic flora of orofacial abscesses. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1983; 41(11): 711-4.

Lim WS, Gander S, Finch RG, Macfarlane JT. A novel method for collecting and detecting amoxicillin in urine: a tool for testing antibiotic compliance in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000; 46(5): 835-7.

Margarit F, Moreno-Dalmau J, Obach R, Peraire C, Pla-Delfina JM. Intestinal absorption kinetics of a series of aminopenicillins and azidocillin. A comparative study in the rat. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 1991; 3: 102-7.

McCartney AC. Changing trends in infective endocarditis. *J. Clin. Path.* 1992; 45(11): 945-8.

McNulty CA, Dent J, Wise R. Susceptibility of clinical isolates of *Campylobacter pylori* to 11 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 28(6): 837-8.

Mendes GB, Franco LM, Moreno RA, Fernandes AG, Muscara MN, de Nucci G. Comparative bioavailability of two suspension formulations of potassium diclofenac in healthy male volunteers. *Int. J. Clin. Pharm. Therap.* 1994; 32(3): 131-5.

Merle-Melet M, Bresler L, Lokiec F, Dopff C, Boissel P, Dureux JB. Effects of diclofenac on ceftriaxone pharmacokinetics in humans. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 1992; 36(10): 2331-3.

Minta JO, Williams MD. Some nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the generation of superoxide anions by activated polymorphs by blocking ligand-receptor interactions. *J. Rheumatol.* 1985; 12(4): 751-7.

Moncada S, Ferreira SH, Vane JR. Inhibition of prostaglandin biosynthesis as the mechanism of analgesia of aspirin-like drugs in the dog knee-joint. *Eur. J. Pharmacol.* 1975; 31(2): 250-60.

Montgomery EH. Antibióticos antibacterianos. In: Neidle EA, Yagiela JA. *Farmacologia e terapêutica para dentistas*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991.

Moore TD, Horton R, Utrup LJ, Miller LA, Poupard JA. Stability of amoxicillin-clavulanate in bacterial medium determined by high-performance liquid chromatography and bioassay. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(5): 1321-2.

Moran M. An observer-blind comparison of diclofenac potassium, piroxicam and placebo in the treatment of ankle sprains. *Curr. Med. Res. Opin.* 1990; 12(4): 268-74.

Mueller EA, Kovarik JM, Koelle EU, Merdjan H, Johnston A, Hitzemberger G. Pharmacokinetics of cyclosporine and multiple-dose diclofenac during coadministration. *J. Clin. Pharmacol.* 1993; 33(10): 936-43.

Neidle EA, Yagiela JA, Dowd, FJ. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*. 4. ed. St Louis: Mosby-Year Book Inc.; 1998.

Omoigui S. *The pain drugs handbook*. St Louis: Mosby; 1995.

Pallasch TJ. Pharmacokinetic principles of antimicrobial therapy. *Periodontol. 2000*. 1996; 10: 5-11.

Peris-Ribera JE, Torres-Molina F, Garcia-Carbonell MC, Aristorena JC, Pla-Delfina JM. Pharmacokinetics and bioavailability of diclofenac in the rat. **J. Pharmacokinet. Biopharm.** 1991; 19(6): 647-65.

Perl TM, Golub JE. New approaches to reduce *Staphylococcus aureus* nosocomial infection rates: treating *S. aureus* nasal carriage. **Ann. Pharmacother.** 1998; 32(1): S7-S16.

Philips I. A guide to sensitivity testing. **J. Antimicrob. Chemother.** 1991; 27: 1-50.

Piddock LJV. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. **J. Appl. Bact.** 1990; 68(4): 307-18.

Pieper R *et al.* Penetration of penicillins into cardiac valves and auricles of patients undergoing open-heart surgery. **Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 19, n.1, p. 49-53, 1985.

Portenoy RK. Practical aspects of pain control in the patient with cancer. In: Hill C S, Portenoy RK. **Pain control in the patient with cancer.** American Cancer Society Inc.; 1989.

Prado FC, Ramos J, Valle JR. **Atualização Terapêutica 2001.** São Paulo: Artes Médicas; 2001.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. **Farmacologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Reynolds JEF. (ed.) **Martindale. The Extra Pharmacopoeia**. Vol. 31. London: Royal Pharmaceutical Society Press; 1996.

Roman RS, Smith J, Walker M, Byrne S, Ramotar K, Dyck B *et al*. Rapid geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. **Clin. Infect. Dis.** 1997; 25(3): 698-705.

Ronchera CL, Hernandez T, Peris JE, Torres F, Granero L, Jimenez NV *et al*. Pharmacokinetic interaction between high-dose methotrexate and amoxicillin. **Ther. Drug Monit.** 1993; 15(5): 375-9.

Sabath LD. Tissue penetration of antibiotics; an overview. **Scand. J. Infect. Dis. Suppl.** 1978; 14: 313-5.

Sabiston CB Jr., Grigsby WR, Segerstrom N. Bacterial study of pyogenic infections of dental origin. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** 1976; 41(4): 430-5.

Sawchuk RJ, Maloney JA, Cartier LL, Rackley RJ, Chan KK, Lau HS. Analysis of diclofenac and four of its metabolites in human urine by HPLC. **Pharm. Res.** 1995; 12(5): 756-62.

Schellack G. **Farmacologia Uma Abordagem Didática**. São Paulo: Fundamento Educacional, 2005.

Schoenmakers RG, Stehouwer MC, Tukker JJ. Structure-transport relationship for the intestinal small-peptide carrier: is the carbonyl group of the peptide bond relevant for transport? **Pharm. Res.** 1999; 16(1): 62-8.

Terada T, Saito H, Mukai M, Inui K. Recognition of beta-lactam antibiotics by rat peptide transporters, PEPT1 and PEPT2, in LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol.* 1997; 273(5): F706-11.

Todd PA, Sorokin EM. Diclofenac sodium: a reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, therapeutic efficacy. *Drugs.* 1988; 35(3): 244-85.

Tomasz A. From penicillin-binding proteins to the lysis and death of bacteria: a 1979 view. *Rev. Infect. Dis.* 1979; 1(3): 434-67.

United States Pharmacopoeia XXII. **The national formulary XVII.** Rockville; 1990.

Van Aubel R, Masereeuw R, Russel F. Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2000; 279(2): F216-32.

Voilley N. Acid-sensing ion channels (ASICs): new targets for the analgesic effects of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 2004; 3(1): 71-9.

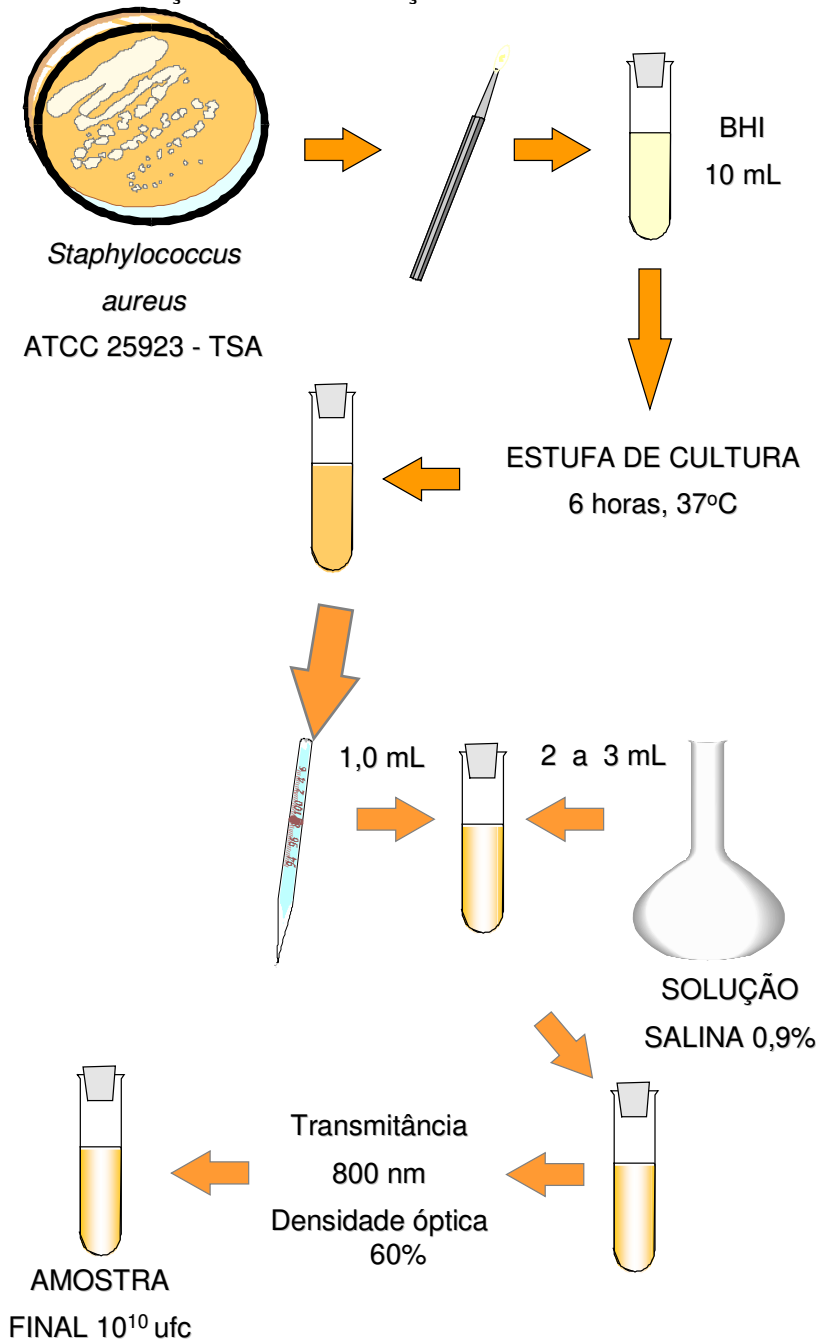
Vree TB, Hekster YA, Baars AM, van der Klein E. Rapid determination of amoxicillin (Clamoxyl) and ampicillin (Penbritin) in body fluids of man by means of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1978; 145: 496-501.

Westphal JF, Brogard JM, Jehl F, Carbon C. Assessment of the role of enterocyte ion exchange in the intestinal absorption of amoxicillin, based on a study of the interaction with amiloride. *Pathol. Biol.* 1995; 43(7): 590-5.

Woods R. Pyogenic dental infections: a ten year review. *Aust. Dent. J.* 1978; 23(1): 107-11.

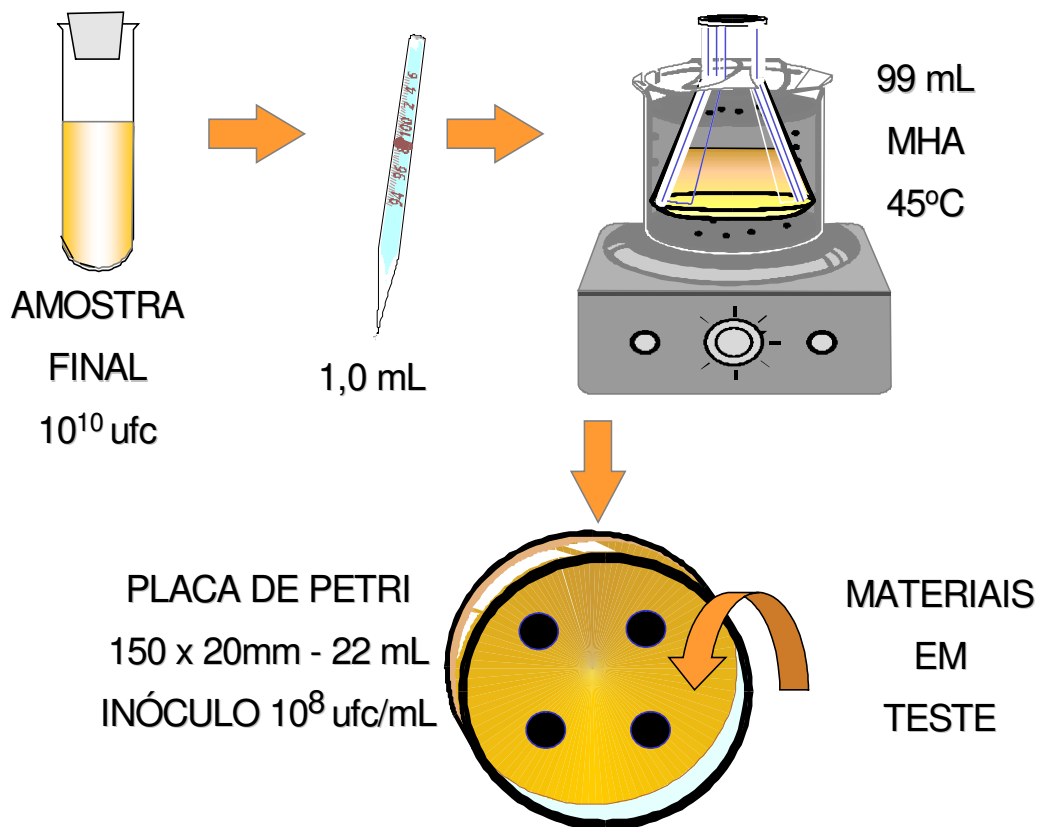
ANEXO 1

Figura 1. Obtenção da concentração de 10^8 u.f.c./mL.



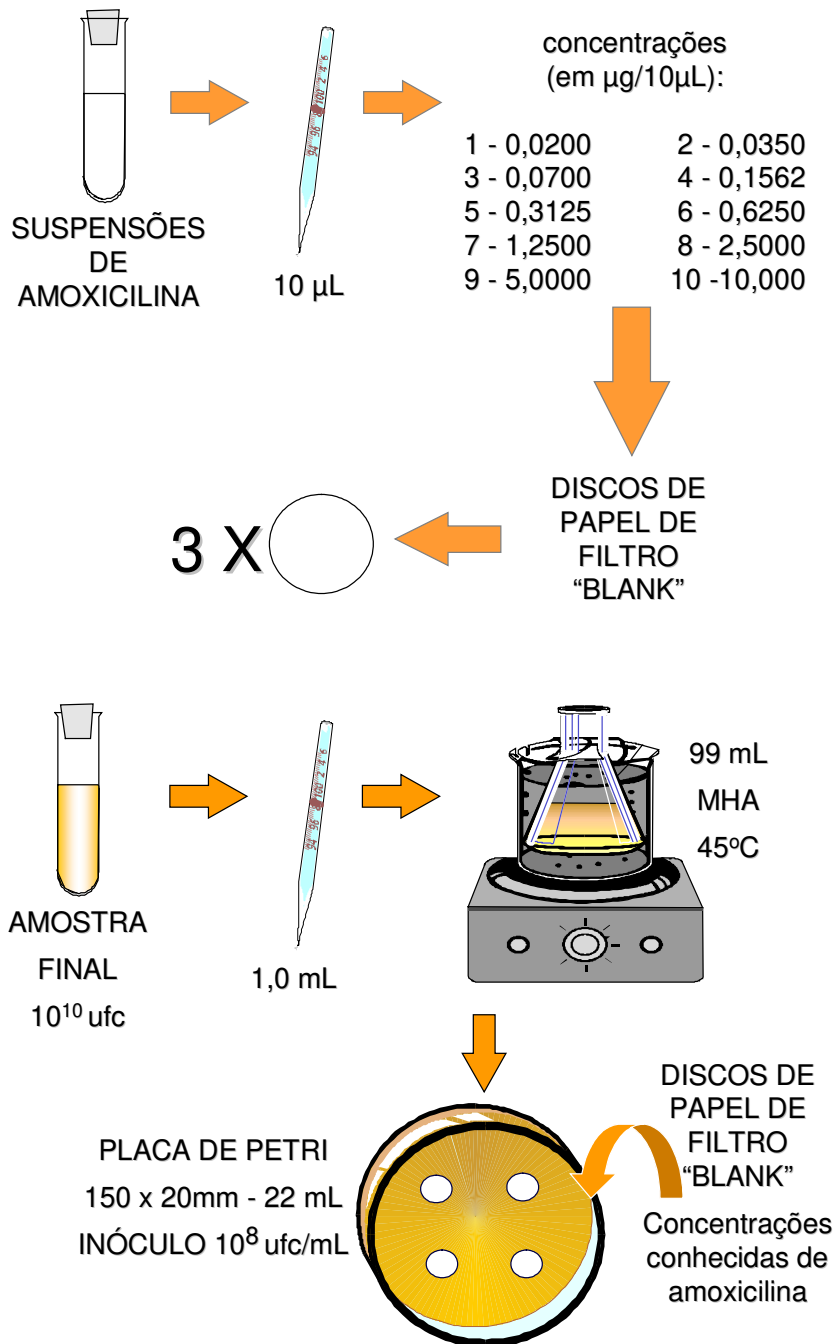
ANEXO 1 (continuação)

Figura 1. Obtenção da concentração de 10^8 u.f.c./mL.



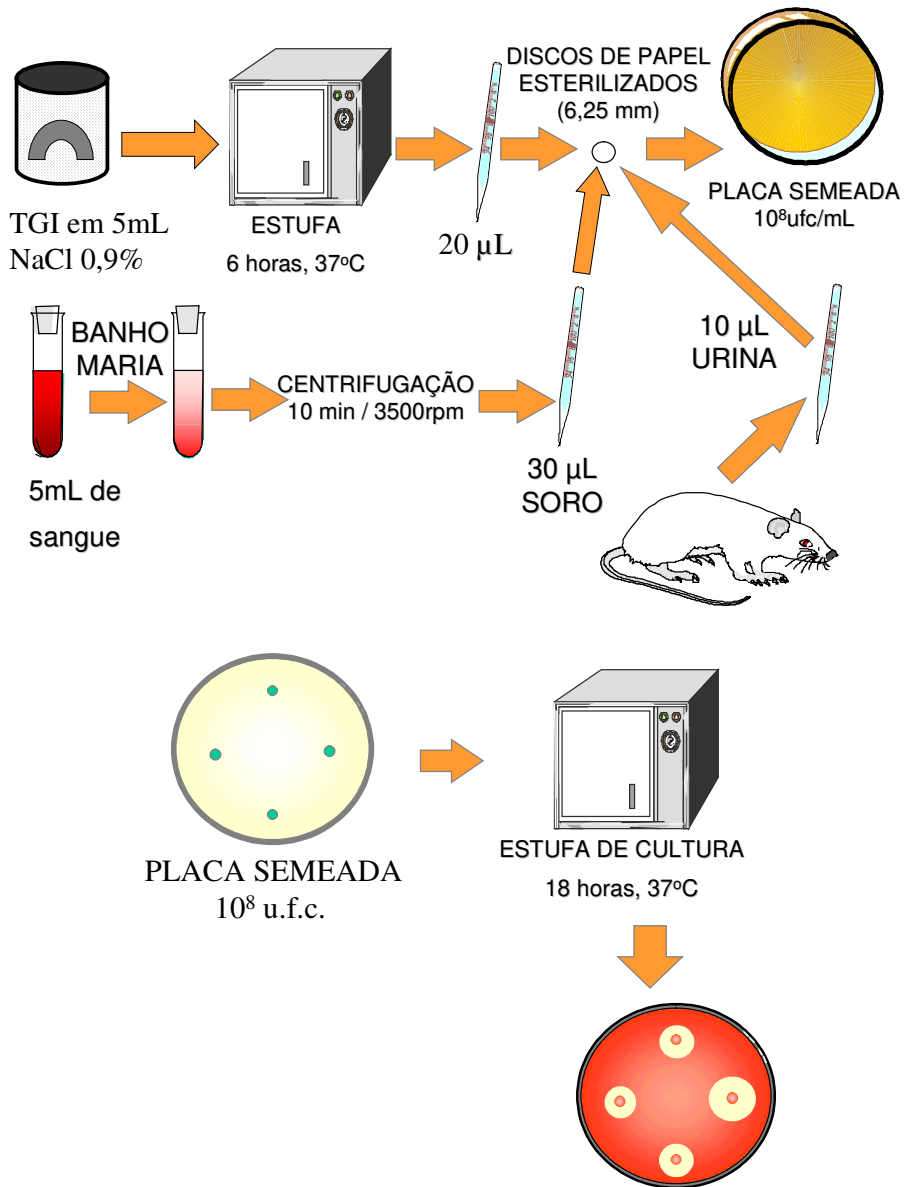
ANEXO 2

Figura 2. Obtenção da curva padrão.



ANEXO 3

Figura 3. Análise das amostras.



ANEXO 4

Tabela 2. Diâmetros, em mm, dos halos de inibição obtidos das alíquotas de cada animal dos grupos G1 e G2, e suas médias, em função do tempo (min).

<u>GRUPO G1</u> <u>TEMPO</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 1</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 2</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 3</u>	<u>MÉDIAS HALOS</u> <u>GRUPO G1</u>
15	21,00	20,00	20,50	20,50
30	22,00	23,00	22,50	22,50
45	29,00	29,50	29,50	29,30
60	32,50	33,00	32,50	32,70
120	39,00	39,00	38,50	38,83
180	40,50	41,00	40,50	40,66
240	41,00	41,00	41,00	41,00
300	41,00	41,00	41,50	41,16
360	41,00	41,50	41,50	41,30

<u>GRUPO G2</u> <u>TEMPO</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 1</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 2</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 3</u>	<u>MÉDIAS HALOS</u> <u>GRUPO G2</u>
15	20,00	20,50	20,50	20,30
30	22,50	23,00	21,50	22,33
45	28,50	30,00	29,00	29,17
60	32,00	33,00	32,50	32,50
120	38,00	38,50	38,50	38,30
180	40,50	41,00	41,00	40,80
240	41,00	41,00	41,00	41,00
300	41,00	41,00	41,00	41,00
360	41,00	41,50	41,00	41,16

ANEXO 5

Tabela 3. Diâmetros, em mm, dos halos de inibição obtidos das alíquotas de cada animal dos grupos D1 e D2, e suas médias, em função do tempo (min).

<u>GRUPO D1</u> <u>TEMPO</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 1</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 2</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 3</u>	<u>MÉDIAS HALOS</u> <u>GRUPO D1</u>
15	32,50	33,50	33,00	33,00
30	32,50	33,50	33,50	33,16
45	33,00	33,50	33,50	33,30
60	33,50	33,50	33,50	33,50
120	33,50	34,00	33,50	33,66
180	34,00	35,00	34,50	34,50
240	35,50	35,50	35,50	35,50
300	35,50	36,00	35,50	35,66
360	35,50	36,00	35,50	35,66

<u>GRUPO D2</u> <u>TEMPO</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 1</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 2</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 3</u>	<u>MÉDIAS HALOS</u> <u>GRUPO D2</u>
15	29,00	29,50	29,50	29,33
30	29,50	29,50	30,00	29,66
45	30,00	31,00	30,50	30,50
60	30,50	31,00	31,00	30,80
120	31,00	32,00	31,50	31,50
180	32,00	32,00	32,00	32,00
240	32,00	32,00	32,00	32,00
300	32,00	32,50	32,00	32,16
360	32,00	32,50	32,00	32,16

ANEXO 6

Tabela 4. Diâmetros, em mm, dos halos de inibição obtidos das alíquotas séricas de cada animal dos grupos S1 e S2, e suas médias, em função do tempo (min).

<u>GRUPO S1</u> <u>TEMPO</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 1</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 2</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 3</u>	<u>MÉDIAS HALOS</u> <u>GRUPO S1</u>
15	32,00	32,50	31,50	32,00
30	34,00	34,50	35,00	34,50
45	36,00	37,00	38,00	37,00
60	40,00	40,00	40,00	40,00
120	37,50	37,50	37,50	37,50
180	36,50	36,50	36,50	36,50
240	35,50	36,50	36,00	36,00
300	35,00	36,00	35,50	35,50
360	35,50	35,50	35,50	35,50

<u>GRUPO S2</u> <u>TEMPO</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 1</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 2</u>	<u>DIÂMETROS DOS</u> <u>HALOS</u> <u>MEDIDA 3</u>	<u>MÉDIAS HALOS</u> <u>GRUPO S2</u>
15	27,50	28,50	28,00	28,0
30	32,00	32,00	32,00	32,0
45	33,00	33,00	33,00	33,0
60	35,50	36,50	36,00	36,0
120	35,00	35,00	35,00	35,0
180	34,00	35,00	34,50	34,5
240	32,50	33,50	33,00	33,0
300	32,00	33,00	32,50	32,5
360	32,00	32,00	32,00	32,0

ANEXO 7

Tabela 5. Diâmetros, em mm, dos halos de inibição obtidos das alíquotas urinárias de cada animal dos grupos R1 e R2, e suas médias, em função do tempo (min).

<u>GRUPO R1</u> <u>TEMPO</u>	DIÂMETROS DOS HALOS <u>MEDIDA 1</u>	DIÂMETROS DOS HALOS <u>MEDIDA 2</u>	DIÂMETROS DOS HALOS <u>MEDIDA 3</u>	<u>MÉDIAS HALOS</u> <u>GRUPO R1</u>
15	37,00	39,00	38,00	38,00
30	40,00	40,00	40,00	40,00
45	40,00	41,00	40,50	40,50
60	41,00	41,00	41,00	41,00
120	43,00	43,00	43,00	43,00
180	39,00	41,00	40,00	40,00
240	38,00	39,00	38,50	38,50
300	36,00	37,00	36,50	36,50
360	36,00	36,00	36,00	36,00

<u>GRUPO R2</u> <u>TEMPO</u>	DIÂMETROS DOS HALOS <u>MEDIDA 1</u>	DIÂMETROS DOS HALOS <u>MEDIDA 2</u>	DIÂMETROS DOS HALOS <u>MEDIDA 3</u>	<u>MÉDIAS HALOS</u> <u>GRUPO R2</u>
15	38,50	39,50	39,00	39,00
30	42,00	42,00	42,00	42,00
45	42,00	43,00	42,50	42,50
60	42,00	44,00	43,00	43,00
120	45,00	45,00	45,00	45,00
180	42,00	43,00	42,50	42,50
240	39,00	41,00	40,00	40,00
300	38,00	38,00	38,00	38,00
360	37,00	38,00	37,50	37,50

ANEXO 8

Tabela 6. Médias dos valores da concentração de amoxicilina, em µg/mL, obtidos das alíquotas de cada animal dos grupos G1 e G2, em função do tempo (min).

<u>TEMPO</u>	<u>CONCENTRAÇÃO AMOXICILINA GRUPO G1</u>	<u>CONCENTRAÇÃO AMOXICILINA GRUPO G2</u>
15	0,009669	0,009043
30	0,016517	0,015973
45	0,100620	0,097308
60	0,256800	0,240176
120	1,323403	1,119513
180	2,114210	2,186154
240	2,337469	2,298685
300	2,417010	2,337469
360	2,499258	2,417010

ANEXO 9

Tabela 7. Médias dos valores da concentração de amoxicilina, em $\mu\text{g/mL}$, obtidos das alíquotas de cada animal dos grupos D1 e D2, em função do tempo (min).

<u>TEMPO</u>	CONCENTRAÇÃO AMOXICILINA <u>GRUPO D1</u>	CONCENTRAÇÃO AMOXICILINA <u>GRUPO D2</u>
15	0,270019	0,104043
30	0,283918	0,111245
45	0,293580	0,142980
60	0,319196	0,150339
120	0,330058	0,183768
180	0,417175	0,210087
240	0,536182	0,210087
300	0,554428	0,213632
360	0,554428	0,213632

ANEXO 10

Tabela 8. Médias dos valores da concentração de amoxicilina, em $\mu\text{g/mL}$, obtidos das alíquotas séricas de cada animal dos grupos S1 e S2, em função do tempo (min).

<u>TEMPO</u>	CONCENTRAÇÃO AMOXICILINA <u>GRUPO S1</u>	CONCENTRAÇÃO AMOXICILINA <u>GRUPO S2</u>
15	0,210087	0,072004
30	0,410253	0,210087
45	0,801130	0,274574
60	1,788485	0,612975
120	0,915869	0,469010
180	0,700766	0,410253
240	0,612975	0,274574
300	0,536182	0,240176
360	0,536182	0,210087

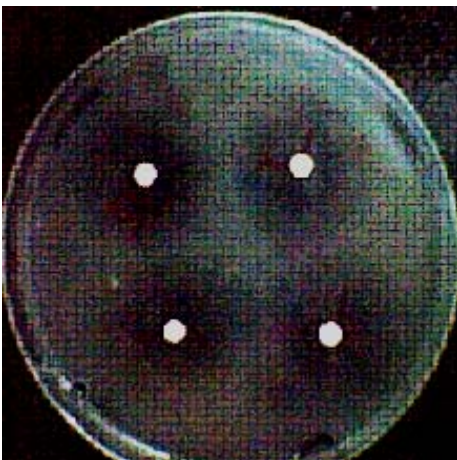
ANEXO 11

Tabela 9. Médias dos valores da concentração de amoxicilina, em $\mu\text{g/mL}$, obtidos das alíquotas urinárias de cada animal dos grupos R1 e R2, em função do tempo (min).

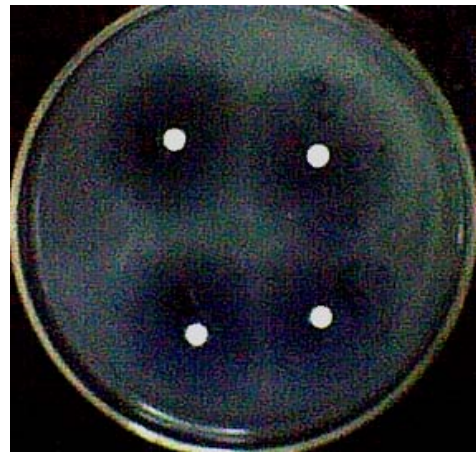
<u>TEMPO</u>	CONCENTRAÇÃO AMOXICILINA <u>GRUPO R1</u>	CONCENTRAÇÃO AMOXICILINA <u>GRUPO R2</u>
15	1,047041	1,368436
30	1,788485	3,054967
45	2,044634	3,492503
60	2,337469	3,992704
120	3,992704	6,820064
180	1,788485	3,492503
240	1,197000	1,788485
300	0,700766	1,047041
360	0,612975	0,915869

ANEXO 12

Figura 4. Halos de inibição obtidos com as amostras de urina dos animais após duas horas da administração intragástrica das drogas.



Amoxicilina
d = 43 mm
(3,99 $\mu\text{g}/\text{mL}$)



Amoxicilina
+
Diclofenaco
d = 45 mm
(6,82 $\mu\text{g}/\text{mL}$)



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 407-1, sobre "Influência do dióxido de sódio sobre a excreção urinária da amoxicilina. Estudo em rato."
sob a responsabilidade de Marcelo de Souza Junqueira
está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 05/07/2002

Campinas, 5 de julho de 2002

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº ".....", entitled ".....",
is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas – UNICAMP) on 1/1.

Campinas 5 de Julho de 2002.

Prof(a) Dr(a) Alba R.M. Souza Brito
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP