

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MARCELO DE SOUZA JUNQUEIRA
CIRURGIÃO-DENTISTA

INFLUÊNCIA DE ANTIINFLAMATÓRIOS SOBRE A
CONCENTRAÇÃO SÉRICA E TECIDUAL DA
AMOXICILINA.
ESTUDO *EX-VIVO*, EM RATOS.

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

PIRACICABA - SP
2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MARCELO DE SOUZA JUNQUEIRA

CIRURGIÃO-DENTISTA

**INFLUÊNCIA DE ANTIINFLAMATÓRIOS SOBRE A
CONCENTRAÇÃO SÉRICA E TECIDUAL DA
AMOXICILINA.**

ESTUDO *EX-VIVO*, EM RATOS.

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCEG-036/83
CPG, 29/04/2002
Thales Rocha de Mattos Filho
Assinatura do Orientador

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

**Orientador: Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho
Banca examinadora: Prof. Dr. José Ranali
Prof. Dr. Neoclair Molina**

**PIRACICABA – SP
2002**

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNIDADE B.C.
Nº CHAMADA T/UNICAMP
J968i
V EX
TOMBO BC/ 49340
PROC 16-837/02
C D X
PREÇO R\$ 14,00
DATA 04/06/02
Nº CPD

CM00168269-3

318 ID 242085

Ficha Catalográfica

J968i Junqueira, Marcelo de Souza.
Influência de antiinflamatórios sobre a concentração sérica e tecidual da amoxicilina. Estudo *ex-vivo*, em ratos. / Marcelo de Souza Junqueira. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.
x, 74f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

I. Medicamentos – Interações (Indireta). 2. Diclofenaco. 3. Testes de sensibilidade bacteriana. 4. Medicamentos – Biodisponibilidade. 5. Antibióticos beta-lactâmicos. 6. Corticosteróides. I. Mattos Filho, Thales Rocha de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2002, considerou o candidato MARCELO DE SOUZA JUNQUEIRA aprovado.

1. Prof. Dr. THALES ROCHA DE MATTOS FILHO

Thales Rocha de Mattos Filho

2. Prof. Dr. NEOCLAIR MOLINA

Neoclair Molina

3. Prof. Dr. JOSE RANALI

Jose Ranali

20024526

AGRADECIMENTOS

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 NEOCLAIR MOLINA, meu primeiro mestre na área de farmacologia, profissional de extrema competência que tive o privilégio de conhecer e espelhar minha carreira. Obrigado pela confiança, pelo apoio e pelo incentivo em mim depositados.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, por meio do Reitor:
HERMANO DE MEDEIROS FERREIRA TAVARES.

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA (FOP – Unicamp),
por meio do diretor: ANTÔNIO WILSON SALLUM.

À Coordenação Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP, por meio
de sua Coordenadora ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY.

A PEDRO LUIZ ROSALEN, 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.

AGRADECIMENTOS

A FRANCISCO CARLOS GROPPPO, amigo e cientista exemplar, pelo seu enorme auxílio.

A JOSÉ RANALI, pelo apoio e incentivo.

A EDUARDO DIAS DE ANDRADE, incentivador e mestre dedicado.

A FÁBIO FERREIRA PERAZZO, pela imprescindível ajuda.

Aos amigos do mestrado 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.

AGRADECIMENTOS

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

Aos ANIMAIS, sacrificados 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.

DEDICATÓRIA

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 esposa Regina e aos meus queridos filhos Mateus, Daniel e Verônica pelo sacrifício dispensado durante minhas ausências no decorrer da elaboração desse trabalho, pela compreensão demonstrada e pelo incentivo, amor e carinho que sempre me proporcionaram.

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

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

dedico esse trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

	página
LISTAS	1
LISTA DAS ILUSTRAÇÕES PRESENTES NO TEXTO	1
LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1. TECIDO GRANULOMATOSO INDUZIDO	11
2.2. MÉTODO MICROBIOLÓGICO	13
2.3. TESTE DE SENSIBILIDADE BACTERIANA	16
2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.5. AMOXICILINA	18
2.6. BETAMETASONA	20
2.7. DICLOFENACO	25
3. PROPOSIÇÃO	29
4. MATERIAL E MÉTODO	30
4.1. MATERIAL	30
4.1.1. DISCOS	30
4.1.2. MEIOS DE CULTURA	30
4.1.3. FÁRMACOS UTILIZADOS	31
4.2. MÉTODO	31
4.2.1. ANIMAIS	31
4.2.2. MICRORGANISMO	32
4.2.3. OBTENÇÃO DO TECIDO GRANULOMATOSO	32
4.2.4. ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS	33
4.2.5. OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 10^8 u.f.c./mL	35
4.2.6. OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO	38
4.2.7. AMOSTRAS DE SANGUE E TECIDOS GRANULOMATOSOS	40
4.2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5. RESULTADOS	43
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	70
ANEXO 1	70
ANEXO 2	71
ANEXO 3	72
ANEXO 4	73
ANEXO 5	74

LISTAS

LISTAS

Lista das ilustrações presentes no texto.

Figura 1 Implante das esponjas.	página 33
Figura 2 Obtenção da concentração de 10^8 u.f.c./mL.	36
Figura 3 Obtenção da curva padrão.	39
Figura 4 Amostras de sangue e tecido granulomatoso.	41
Gráfico 1 Valores médios do peso úmido ($\pm$ erro padrão), em mg, do tecido granulomatoso formado.	43
Tabela 1 Diâmetros, em mm, dos halos de inibição correlacionados com as quantidades de amoxicilina, em μ g.	44
Gráfico 2 Curva padrão ou de regressão.	45
Figura 5 Halos de inibição obtidos com as amostras teciduais provindas dos grupos 4 e 5.	46
Figura 6 Halos de inibição obtidos com as amostras séricas provindas dos grupos 4 e 5.	47
Gráfico 3 Representação gráfica dos valores médios das concentrações sérica, em μ g/mL, e tecidual, em μ g/g, de amoxicilina obtidos nos grupos tratados com este antimicrobiano.	48
Tabela 2 Diâmetros, em mm, dos halos de inibição obtidos das amostras teciduais de cada animal (grupos 1, 4 e 5) e suas médias.	70

LISTAS

Tabela 3 Diâmetros, em mm, dos halos de inibição obtidos das alíquotas séricas de cada animal (grupos 1, 4 e 5) e suas médias.	71
Tabela 4 Valores da concentração tecidual e sérica de amoxicilina (em $\mu\text{g/g}$) do grupo 1 (amoxicilina) e suas médias.	72
Tabela 5 Valores da concentração tecidual e sérica de amoxicilina (em $\mu\text{g/g}$) do grupo 5 (amoxicilina + betametasona) e suas médias.	73
Tabela 6 Valores da concentração tecidual e sérica de amoxicilina (em $\mu\text{g/g}$) do grupo 4 (amoxicilina + diclofenaco sódico) e suas médias.	74

LISTAS

Lista das abreviaturas presentes no texto:

5-HETE	hidroxieicosatetraenóico
5-HPETE	hidroperoxieicosatetraenóico
±	mais ou menos
%	por cento
°C	graus Celsius
&	e
µg	micrograma
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
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)
et al.	e outros
g	grama
g/dia	grama por dia
HPA	hipotálamo-hipófise-adrenal
HPLC	high performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta performance)
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)
mL	mililitros
mm	milímetro
n	número de animais por grupo
nm	nanômetro
PGE ₂	prostaglandina-E ₂
PGI ₂	prostaciclina
PLPs	proteínas de ligação às penicilinas
PVC	policlorovinil
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

A prescrição de antimicrobianos associados a antiinflamatórios é uma prática comum em odontologia, embora na maioria das vezes não haja justificativa para tal conduta. O objetivo deste trabalho foi avaliar, em estudo *ex-vivo* em ratos, os efeitos da betametasona e do diclofenaco sódico, nas concentrações plasmáticas e teciduais de amoxicilina. Foram utilizados 56 ratos Wistar machos (7 grupos, n= 8), com idade de 6 semanas. Esponjas de PVC (policlorovinil) foram implantadas em quatro pontos no dorso de cada animal. Sete dias depois, foram administradas, por via intragástrica: amoxicilina 25mg/Kg (grupo 1), diclofenaco sódico 2,5mg/Kg (grupo 2), betametasona 0,1 mg/Kg (grupo 3), diclofenaco sódico 2,5mg/Kg + amoxicilina 25 mg/Kg (grupo 4), betametasona 0,1mg/Kg + amoxicilina 25 mg/Kg (grupo 5), diclofenaco sódico 2,5mg/Kg + betametasona 0,1mg/Kg (grupo 6) e 1,0mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% (grupo 7 ou controle). Após 90 minutos, foram colhidos e colocados 2 tecidos granulomatosos e amostras séricas de cada animal em meio de cultura ágar Mueller-Hinton (MHA) inoculado com 10^8 unidades formadoras de colônia por mL (u.f.c./mL) de *S. aureus*. Os halos de inibição foram medidos após 18 horas de incubação dos tecidos granulomatosos e do soro sanguíneo e, através do teste microbiológico, foram obtidas as quantidades séricas e teciduais da amoxicilina. Os resultados mostraram que quando a amoxicilina foi administrada isoladamente produziu a

RESUMO

mesma concentração tecidual e sérica que o grupo em que foi administrada associada com a betametasona. Porém, quando associada ao diclofenaco essas concentrações mostraram-se reduzidas. Concluiu-se que quando houver necessidade de associação da amoxicilina a um antiinflamatório, por curto período de tempo, deve-se dar preferência ao uso de betametasona em detrimento do diclofenaco sódico.

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

ABSTRACT

ABSTRACT

The prescription of antibiotics associated to anti-inflammatory is common in dentistry and its effects have been studied. Thus, the aim of this work was to evaluate the interaction among amoxicillin, sodium diclofenac and betametasone in tissues and serum, utilizing *ex-vivo* model. It was used 56 male Wistar rats (7 groups, n= 8), six weeks old, kept in acclimatized environment with food and water *ad libitum*. It was implanted four sponges of PVC under the back skin of each animal. Seven days later, it was administered p.o.: amoxicillin 25mg/kg (group 1), sodium diclofenac 2.5mg/kg (group 2), betametasone 0.1mg/Kg (group 3), sodium diclofenac 2.5mg/Kg + amoxicillin 25mg/Kg (group 4), betametasone 0.1mg/kg + amoxicillin 25mg/Kg (group 5), sodium diclofenac 2.5mg/Kg + betametasone 0.1mg/Kg (group 6) and 1.0mL of solution of sodium chloride 0.9% (group 7). After 90 minutes, the granulomatous tissues were collected and placed in MHA with *S. aureus* 10^8 c.f.u./mL. At the same time the blood was collected, centrifuged and 30 μ L of the serum placed in MHA with *S. aureus* 10^8 c.f.u./mL. After 18 hours of incubation, the inhibition zones were measured. The tissue inhibition zones of the interaction between amoxicillin and sodium diclofenac showed a medium value of 21.44mm and a tissue concentration of 0.42 μ g/g, while amoxicillin and betametasone association showed 26.69mm and a tissue concentration of 1.39 μ g/g. The serum inhibition zones of the interaction between amoxicillin and sodium diclofenac showed a medium value of 21.19mm and a

ABSTRACT

serum concentration of 0.42µg/mL, while amoxicillin and betametasone association showed 25.53mm and a serum concentration of 1.41µg/mL. The amoxicillin and sodium diclofenac association had presented a lower tissue and serum concentration of the antibiotic in relation to its association with betametasone.

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

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A presença de medicamentos com vários princípios ativos no mercado, a automedicação, a idade avançada dos pacientes e as doenças crônicas, são alguns dos fatores que contribuem para o aumento da ocorrência de interações entre drogas. Interação medicamentosa é a ação de uma droga sobre a toxicidade ou efetividade da outra (PRADO *et al.*, 2001).

Segundo GOODMAN & GILMAN (1996) ela ocorre, *in vivo*, quando os fármacos interagem em qualquer ponto durante sua absorção, distribuição, metabolismo, excreção (interações farmacocinéticas) ou interagem em um local receptor comum ou ainda quando têm efeitos cumulativos ou inibidores devido a ações em diferentes locais de um órgão (interações farmacodinâmicas). Desta forma, torna-se necessário que se tenha à disposição informações sobre as possíveis interações entre duas ou mais drogas prescritas simultaneamente.

Existem importantes interações medicamentosas indesejáveis tanto com os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) como com os corticosteróides e penicilinas, que podem resultar em grande número de complicações clínicas (NEIDLE *et al.*, 1998).

INTRODUÇÃO

O diclofenaco sódico é um antiinflamatório não esteroideal derivado do grupo do ácido fenilacético que possui alto grau de atividade antiinflamatória e analgésica por inibir as ciclooxigenases e a prostaglandina-sintetase, diminuindo a síntese e liberação de prostaglandinas, além de deprimir diretamente nociceptores sensibilizados (TONUSSI & FERREIRA, 1994). Possui efeito significativo de primeira passagem (50%), é extensa e rapidamente metabolizado no fígado (GEIGY, 1988; TODD & SORKIN, 1988) e comumente empregado em associação com a amoxicilina na clínica diária.

A betametasona é um glucocorticóide com ação antiinflamatória inibidora da fosfolipase A₂ (FERREIRA, 1990). Os corticosteróides, quando empregados em dose única ou por tempo restrito, são praticamente desprovidos de efeitos colaterais clinicamente significativos (CLAMAN, 1983).

A amoxicilina é usada como droga de primeira escolha em várias situações na medicina e na odontologia. Trata-se de uma penicilina de amplo espectro, não resistente às betalactamases, pertencente ao grupo das penicilinas semi-sintéticas (NEIDLE *et al.*, 1998).

Vários métodos têm sido utilizados para se estudar a farmacocinética, principalmente a distribuição de antimicrobianos em sítios extravasculares, em humanos e animais. No caso de animais, a indução da formação de tecido

INTRODUÇÃO

granulomatoso tem se mostrado um método muito aceito. Trata-se de tecido envolto por cápsula fibrosa, com a área central necrótica ou fibrinosa contendo monócitos, macrófagos e células epitelióides dependendo da fase evolutiva em que se encontre (McKINNEY, 1981) e pode ser induzido com a implantação de vários materiais, como esponjas de PVC (GRINDLAY & WAUGH, 1951; VIZIOLI, 1973; ANDRADE, 1980; MATTOS-FILHO, 1990).

Com a finalidade de avaliar os efeitos da amoxicilina e de sua associação com a betametasona ou com o diclofenaco sódico, sobre cultura estafilocócica, bem como, avaliar os efeitos dessas associações sobre a concentração sérica da amoxicilina, foram utilizados tecidos granulomatosos induzidos em ratos e teste de sensibilidade bacteriana *in vitro*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – TECIDO GRANULOMATOSO INDUZIDO

A inflamação é um processo que começa após injúria tecidual e termina com a destruição permanente do tecido ou com seu completo reparo (EBERT & GRANT, 1974).

No primeiro estágio da inflamação (estágio agudo) são liberados, por exocitose, mediadores inflamatórios pré-formados, como a histamina, causando vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar. No segundo estágio (estágio subagudo) as células inflamatórias migram e invadem o local. As moléculas de adesão celular, as prostaglandinas, os leucotrienos, o fator de ativação das plaquetas e as citocinas desempenham importante papel nesse estágio. No terceiro estágio da inflamação (estágio crônico) ocorre a fase linfocítica da lesão, relacionada com o processo de limpeza e reparo. As citocinas, em particular as interleucinas e o fator de necrose tumoral α , são proeminentes nesse estágio. Na sequência haverá reparo do tecido (DINARELLO, 1992).

A formação de tecido granulomatoso é uma reação imunológica especializada e filogeneticamente primitiva do corpo frente a um irritante,

REVISÃO DA LITERATURA

caracterizada por coleção localizada de células epitelióides, macrófagos e linfócitos (CHATTOPADHYAY, 1994).

O tecido granulomatoso pode ter sua formação induzida com a implantação de dispositivos porosos ou ocos no organismo animal. Esses materiais podem ser câmaras, discos ou tiras de algodão (RENNEBERG & WALDER, 1988). Este tecido difere do tecido de granulação (McKINNEY, 1981) e possui morfologia e seqüência de formação bem conhecida (ANDRADE, 1980; GEVARTOSKY, 1984; MATTOS-FILHO, 1990).

Tecidos granulomatosos induzidos em ratos, retirados sete dias após implantação subcutânea das esponjas de PVC, apresentaram cápsula fibrosa bem delimitada envolvendo as esponjas. Fibroblastos, células mesenquimais e formações capilares foram observados em larga escala (GRÖPPO *et al.*, 2000).

Os modelos experimentais que utilizam a reação inflamatória a esponjas de PVC, implantadas via subcutânea em animais, têm sido muito utilizados em pesquisas, para a avaliação de células endoteliais em tecidos neovascularizados (VALLIEN *et al.*, 2000), da velocidade de absorção de drogas aplicadas topicamente (POHUNCOVA *et al.*, 1996) ou do uso terapêutico de células T tumor-específicas (CHEN *et al.*, 1994).

É de especial interesse para o presente trabalho que esses modelos, chamados modelos *ex-vivo*, permitem também avaliar a capacidade de penetração dos antimicrobianos e a presença de fagócitos e anticorpos num local específico (ZAK & O'REILLY, 1991).

2.2 - MÉTODO MICROBIOLÓGICO

Considerando-se a farmacodinâmica, a farmacocinética e a atividade antimicrobiana de um fármaco, o tempo de tratamento poderia ser definido como o tempo durante o qual a concentração do agente é maior do que a concentração inibitória mínima (CIM) do agente antimicrobiano frente ao patógeno, no local da infecção. Entretanto, em processos infecciosos ricos em fibrina ou avasculares, o nível da droga não reflete aquele do soro (BARZA & WEINSTEIN, 1974).

As concentrações nos tecidos e fluidos sem barreiras para a penetração de drogas, por outro lado, são geralmente previsíveis a partir de seus níveis plasmáticos. Isto é válido tanto para antimicrobianos hidrossolúveis como os beta-lactâmicos, como para os lipossolúveis como as quinolonas e vários macrolídeos (MAZZEI *et al.*, 1992).

Os níveis teciduais de antimicrobianos representam as médias de diferentes concentrações nos compartimentos tissulares maiores: fluido intersticial,

REVISÃO DA LITERATURA

células e capilares sangüíneos. Como a maioria das infecções bacterianas começa e se desenvolve no líquido intersticial, os níveis teciduais totais não são terapeuticamente importantes, embora sejam com freqüência comparados com a CIM bacteriana (CARS, 1990).

Drogas que penetram e se acumulam nas células podem alcançar níveis teciduais que ultrapassam os níveis séricos. Drogas não-lipofílicas, como os antimicrobianos betalactâmicos que não penetram nas células, são confinadas no fluido extracelular que constitui aproximadamente 20% do tecido. Em razão disto, seus níveis teciduais totais são menores (CARS, 1990).

Os parâmetros farmacocinéticos de agentes antimicrobianos se correlacionam bem com a eficácia terapêutica em modelos animais, sempre que parâmetros farmacodinâmicos são levados em consideração. O tempo no qual os níveis séricos excedem a CIM é o parâmetro mais significativo para se determinar a eficácia dos betalactâmicos (DALHOFF & ULLMANN, 1990).

Várias técnicas têm sido desenvolvidas com a finalidade de avaliar adequadamente a penetração tecidual e a quantidade de agentes antimicrobianos em amostras muito pequenas de fluido ou tecido (SABATH, 1978).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

REVISÃO DA LITERATURA

Para a determinação da concentração de antimicrobianos pode-se utilizar, entre outros, diferentes métodos como espectrofotometria em ultravioleta (DEVANI *et al.*, 1992), iodometria e método óptico (US PHARMACOPEIA, 1990), mercurimetria (BRITISH PHARMACOPEIA, 1988) e o método microbiológico (KOROLKOVAS, 1988). Para a determinação em fluidos biológicos pode-se citar a cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

PIEPER *et al.* (1985) utilizaram válvulas e aurículas cardíacas, método microbiológico e curva de regressão para a determinação dos níveis séricos e teciduais de cloxacilina e benzilpenicilina em humanos.

Utilizando o método microbiológico, GROPPPO (1996) determinou a concentração sérica e tecidual (tecido granulomatoso induzido) de amoxicilina, 60 minutos após sua administração, em ratos.

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

REVISÃO DA LITERATURA

2.3 - TESTE DE SENSIBILIDADE BACTERIANA

Embora as interações entre microrganismos e agentes antimicrobianos *in vitro* sejam com frequência marcadamente diferentes daquelas *in vivo*, presumivelmente devido a fatores farmacológicos e às defesas do hospedeiro (BARZA, 1978), o desenvolvimento e a avaliação de drogas estão intimamente relacionados com modelos animais. Experimentos clínicos têm mostrado a efetividade de testes animais na maioria dos casos, e que os esforços para seus aperfeiçoamentos têm sido importantes (GAUNT, 1977).

Com base em dados da literatura e achados experimentais, várias sugestões são apresentadas para melhorar o método de difusão em ágar para a determinação da sensibilidade bacteriana a antibióticos, sendo que o ágar Mueller-Hinton (MHA) é o meio de cultura mais empregado e indicado (GIVENTAL *et al*, 1980; PIDDOCK, 1990; KONEMAN *et al*, 1992).

Os testes de difusão em ágar utilizados para determinar a sensibilidade bacteriana a antibióticos são realizados em placas de Petri semeadas com inóculo entre 10^6 a 10^8 u.f.c./mL. 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 CIM previamente estabelecida (BAUER *et al*, 1966; PIDDOCK, 1990; KONEMAN *et al*, 1992).

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

2.4 - *Staphylococcus aureus*

O *staphylococcus aureus* é parte integrante da microbiota normal humana (CARNEY *et al.*, 1985), sendo que aproximadamente 30% das infecções causadas por essa bactéria são devidas à microbiota endógena (PERL & GOLUB, 1998). É 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).

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

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

2.5 - AMOXICILINA

As penicilinas estão entre os antimicrobianos mais prescritos para infecções comunitárias e hospitalares. A estrutura básica destes antimicrobianos é composta por anel beta-lactâmico, anel tiazolidínico e pela cadeia lateral, responsável pela maior parte das características farmacodinâmicas e do espectro de ação destas drogas (NEIDLE *et al.*, 1998).

O mecanismo de ação das 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).

A amoxicilina é uma penicilina com características semelhantes à ampicilina (FONSECA, 1988; MONTGOMERY, 1991; NATHWANI & WOOD, 1993), sendo mais bem absorvida pela via oral (90%). Sua absorção não é afetada por alimentos, possui boa distribuição por todo o organismo, com taxa de ligação às proteínas plasmáticas (LPP) de 17 a 20 % e não sofre modificações moleculares, sendo excretada em sua forma ativa pelos rins (CROYDON & SUTHERLAND, 1970; AMATO-NETO *et al.*, 1985; FONSECA, 1988; DAJANI *et al.*, 1994).

REVISÃO DA LITERATURA

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

Uma percentagem crescente de cepas de *E. coli*, *P. mirabilis*, *H. influenzae* e a maioria das espécies de *Shigella* estão se tornando resistentes à ampicilina (SANDERS & SANDERS, 1992).

Distúrbios gastrintestinais e outras alterações na ecologia microbiana normal são alguns dos poucos efeitos indesejáveis das penicilinas, as quais constituem também a causa mais comum de alergia a drogas (NEIDLE *et al.*, 1998).

A supressão da microbiota gastrintestinal normal pela amoxicilina, ampicilina, penicilina V e antibióticos não relacionados às penicilinas reduz, teoricamente, a disponibilidade das enzimas que regeneram os esteróides ativos que sofreram conjugação no fígado e retomaram ao intestino através da bile para serem reabsorvidos (ciclo êntero-hepático), resultando na inibição da eficácia dos anticoncepcionais orais. Pacientes do sexo feminino devem ser informados quanto à possibilidade dessa interação medicamentosa (BARNETT, 1995).

REVISÃO DA LITERATURA

Grandes doses de penicilinas, por via parenteral, podem antagonizar a ligação do difosfato de adenosina aos receptores plaquetários, produzindo manifestações hemorrágicas (BABIÁK & RYBAK, 1986).

A dosagem usual da amoxicilina situa-se entre 250 a 500mg a cada 6 ou 8 horas (1 a 2g/dia) em adultos e 25 a 50mg/Kg/dia para crianças (AMATO-NETO *et al*, 1985).

Níveis séricos máximos entre 7,6 e 10,8µg/mL, foram obtidos após administração oral de 500mg de amoxicilina (NEU & WINSHELL, 1970).

Com dose de 40mg/kg de amoxicilina foram obtidos picos plasmáticos de 9,0; 14,5; 10,7 e 3,7µg/mL dentro de 1, 2, 4 e 6 horas, respectivamente, após a administração do antimicrobiano (DAJANI *et al.*, 1994).

2.6 - BETAMETASONA

Os corticosteróides são agentes antiinflamatórios que previnem a formação de ácido aracdônico através da inibição da fosfolipase A2 (FERREIRA, 1990). Tem sido proposto que eles também interferem com o mecanismo de regulação da biosíntese da serotonina no sistema nervoso central (NAPPI & MANZONI, 1990).

REVISÃO DA LITERATURA

A maior parte da ação dos corticosteróides não é imediata, mas vai se manifestar depois de várias horas da sua administração. Isto se dá devido ao mecanismo de ação dessas drogas, que requer tempo necessário para que elas possam efetuar as alterações na expressão genética e na síntese protéica (GOODMAN & GILMAN, 1996).

Em contraste com esses efeitos genômicos, algumas ações dos glicocorticóides parecem ocorrer numa fase mais precoce, sendo provavelmente mediadas por receptores ligados à membrana plasmática das células alvo (WEHLING, 1994).

Os receptores de corticosteróides são membros de uma super família de proteínas correlacionadas estruturalmente, os receptores nucleares, que traduzem os efeitos de um grupo diverso de pequenos ligantes hidrofóbicos, inclusive os hormônios esteróides, hormônio tireóideo, vitamina D e retinóides (MANGELSDORF *et al.*, 1994).

Apesar da alta especificidade para indução da transcrição genética pelos glicocorticóides, também foram identificados genes cuja expressão é regulada negativamente por esses fármacos (SAATCIOGLU *et al.*, 1994).

REVISÃO DA LITERATURA

A betametasona é um antiinflamatório esteróide imunossupressor (PETERSEN *et al.*, 1983). As ações imunossupressoras e antiinflamatórias dos glicocorticóides estão ligadas fortemente, talvez porque ambas resultam, em grande parte, da inibição de funções específicas dos leucócitos (CHROUSOS, 1995). Também existem consideráveis evidências indicando que múltiplas citocinas regulam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (REICHLIN, 1993).

Embora pareça paradoxal usar glicocorticóides imunossupressores nas doenças infecciosas, existe um número limitado de quadros onde eles estão indicados na terapia de patógenos infecciosos específicos como em portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) com pneumonia por *Pneumocystis carini* e hipóxia moderada a grave (McGOWAN *et al.*, 1992).

Os indivíduos com supressão da função supra-renal são incapazes de responder satisfatoriamente a situações estressantes, como ansiedade, infecção aguda ou procedimento cirúrgico, através do aumento na liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e produção de cortisol. Para se avaliar o grau da supressão, pode-se admitir que o paciente que recebeu 30mg de hidrocortisona ou seu equivalente durante quatro semanas ou mais, ou 80mg de hidrocortisona por mais de duas semanas apresenta algum grau de supressão supra-renal (BLONDE *et al.*, 1982).

REVISÃO DA LITERATURA

O uso prolongado de corticosteróides pode causar efeitos metabólicos profundos e variados, modificando as respostas imunes do organismo aos diversos estímulos, sendo contra-indicado em diversas situações clínicas como: hipertensão, diabetes, úlcera gastroduodenal e catarata (PRADO *et al.*, 2001).

Os glicocorticóides, em tratamento prolongado, mobilizam aminoácidos através da inibição da síntese protéica no músculo, tecido conjuntivo e pele. Concomitantemente estimulam especificamente a síntese hepática da glicose a partir dos aminoácidos (PILKIS & GRANNER, 1992).

O mecanismo envolvido na formação de úlceras associadas ao tratamento prolongado com glicocorticóides é provavelmente relacionado com a síntese diminuída de prostaciclina (PGI₂) e prostaglandina E₂ (PGE₂), que proporcionam proteção à mucosa gástrica. Entretanto, PIPER *et al.*, 1991 relataram que a maior parte dos pacientes que desenvolveram sangramento gastrointestinal enquanto recebiam corticosteróides, também receberam AINEs, que são conhecidos por produzir ulceração.

A osteoporose é uma seqüela comum devido à corticoterapia prolongada, podendo resultar em aumento da suscetibilidade a fraturas traumáticas e fraturas por compressão das vértebras (ADACHI *et al.*, 1993).

REVISÃO DA LITERATURA

Distúrbios do comportamento são comumente notados após a administração de corticosteróides e em pacientes que apresentam síndrome de Cushing secundária ao hipercorticismismo endógeno; esses distúrbios podem assumir muitas formas, incluindo nervosismo, insônia, alterações do humor ou na psique, e psicose franca (HASKETT, 1985).

Porém, na ausência de contra-indicações, a dose única de corticosteróides, mesmo sendo suprafisiológica, é praticamente desprovida de efeitos colaterais clinicamente significantes (CLAMAN, 1983). Neste protocolo terapêutico os glicocorticóides não interferem nos mecanismos de hemostasia, diferente dos AINEs que, pela sua ação antiagregante plaquetária, aumentam o risco de hemorragia pós-operatória (CASHMAN & McANULTY, 1995).

Os glicocorticóides não provocam distúrbios gastrintestinais quando empregados em dose única ou por tempo restrito, ao contrário da maioria dos AINEs, que atuam sobre a enzima cicloxigenase-1 (constitutiva) inibindo-a, e conseqüentemente, inibindo a síntese de prostaglandinas responsáveis pela proteção da mucosa gástrica e reguladoras da função renal (VAN DER ZWAN *et al.*, 1982).

Os glicocorticóides, por inibirem a síntese dos leucotrienos e por outros mecanismos, exercem efeito antialérgico, ao contrário da maioria dos AINEs, cujo

REVISÃO DA LITERATURA

FERREIRA, 1972; MONCADA *et al.*, 1975), vários outros mecanismos de ação têm sido demonstrados (TIENGO *et al.*, 1989; TIENGO, 1996).

O diclofenaco, além de inibir as COX, também pode reduzir as concentrações de ácido aracdônico em algumas células inflamatórias (BROOKS & DAY, 1991) e inibir a ação da lipoxigenase (SIEGEL *et al.*, 1980; MYERS & SIEGEL, 1983; PEREZ *et al.*, 1987; PIPITONE, 1988).

Concentrações altas de diclofenaco podem inibir os ácidos hidropoxieicosatetraenóico (5-HPETE) e hidroxieicosatetraenóico (5-HETE), quimiotáticos para polimorfonucleares, além de inibir os leucotrienos (KU *et al.*, 1986; FRANCO, 1995).

Os AINES estão contra-indicados para pacientes com úlceras ou inflamações gastroduodenais. O seu uso prolongado pode provocar toxicidade renal por diminuição do fluxo sangüíneo local e da taxa de filtração glomerular (BREZIN *et al.*, 1979; CIABATTONI *et al.*, 1984; CLIVE & STOFFI, 1984; CARMICHAEL & SHANKEL, 1985) e, eventualmente, alterações na hematopoiese (FARID *et al.*, 1971; BÖTTINGER *et al.*, 1979; HEIMPEL & HEIT, 1980; KORNBERG & RACHMILEWITZ, 1982; LEE *et al.*, 1982).

REVISÃO DA LITERATURA

uso está associado a maior número de reações de hipersensibilidade de intensidade variável, inclusive a anafilaxia fatal (HOUSHOLDER, 1985; CASHMAN & McANULTY; 1995).

A absorção da betametasona por via oral é rápida e quase completa (72%). Sua união às proteínas plasmáticas é alta (até 70%). Apresenta meia-vida plasmática de aproximadamente 6 horas e sofre excreção renal (metabólitos) em torno de 5% (GOODMAN & GILMAN, 1996).

2.7 - DICLOFENACO

O diclofenaco sódico é um antiinflamatório não esteroidal derivado do grupo do ácido fenilacético com alto grau de atividade antiinflamatória (MORAN, 1990; FRANCO, 1995).

Inibe a ação das cicloxigenases (COX) e prostaglandina-sintetases, diminuindo a síntese e a liberação das prostaglandinas e a produção de superóxidos (MINTA & WILLIAMS, 1985; FRIMAN *et al.*, 1986; ABRAMSON *et al.*, 1990).

Apesar de a ação antiinflamatória dos AINES estar sendo interpretada como consequência da inibição das prostaglandinas (FERREIRA *et al.*, 1971;

REVISÃO DA LITERATURA

Os efeitos colaterais dose-dependentes mais freqüentes causados pelo uso dos AINES são: esofagite, dispepsia, gastrite, erosões gástricas e úlceras pépticas, podendo levar a graves perdas sangüíneas (JICK, 1981; SILVOSO *et al.*, 1979; LANZA *et al.*, 1981; ROTH, 1986; BIOUR *et al.*, 1987; COLLINS & DU TOIT, 1987; LUND, 2001).

Os efeitos colaterais não dose-dependentes, como prurido ou "rashes" cutâneos, são geralmente causados por reações alérgicas ao medicamento (BAILIN & MATKALUK, 1982). Reações anafiláticas são observadas principalmente em pacientes com hipersensibilidade que apresentam diagnóstico de asma, rinite vasomotora e pólipos nasais (SZCZEKLICK, 1983).

Após administração oral o diclofenaco sódico sofre efeito significativo de primeira passagem (50%), é extensa e rapidamente metabolizado no fígado e excretado na urina em torno de 50 a 70% e nas fezes 30 a 35% em 96 horas, sendo uma mínima parte (1%) excretada intacta (GEIGY, 1988; TODD & SORKIN, 1988).

O diclofenaco possui boas propriedades antimicrobianas sobre bactérias Gram-positivas e negativas, *in vitro*. Trabalho recente mostra CIM entre 50 a 100µg/mL para a maioria de 397 cepas testadas. Doses de 1,5 e 3mg/kg

REVISÃO DA LITERATURA

protegeram camundongos contra *Salmonella typhimurium* (ANNADURAI *et al.*, 1998).

A administração de 2,5mg/Kg de diclofenaco sódico por via intramuscular, associada a 25mg/Kg de amoxicilina por via intragástrica, afetou negativamente a concentração sérica e tecidual do antimicrobiano em ratos (SIMÕES, 2000).

PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

Este trabalho pretende:

Avaliar os efeitos da betametasona e do diclofenaco sódico, sobre as concentrações séricas e teciduais de amoxicilina, em ratos.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 – MATERIAL

4.1.1 – DISCOS

Para o ensaio da concentração sérica e para o 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 120⁰C por 15 minutos.

Para indução de tecido granulomatoso foram utilizados discos de esponja de PVC (RENNEBERG & WALDER, 1988), com 5mm de diâmetro por 5mm de altura cortados com perfurador e esterilizados em autoclave a 120⁰C por 15 minutos.

4.1.2 – MEIOS DE CULTURA

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

MATERIAL E MÉTODO

Para o teste de sensibilidade bacteriana, utilizou-se o ágar Mueller-Hinton (MHA – Oxoid Co), que foi distribuído (22mL) 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.

4.1.3 – FÁRMACOS UTILIZADOS

Foram utilizadas soluções injetáveis de fosfato dissódico de betametasona (Celestone[®] – Schering-Plough S/A) na concentração de 0,10mg/mL e de diclofenaco sódico (Voltaren[®] – Novartis Biociências S/A) na concentração de 2,5mg/mL e suspensão de amoxicilina triidratada (Sigma Co) na concentração de 25mg/mL.

4.2 – MÉTODO

4.2.1 – ANIMAIS

Foram utilizados 56 ratos (*Rattus norvegicus* – albinus, Wistar), machos, adultos jovens (60 dias), com peso entre 150 e 200g, S.P.F. (Specific pathogen free), fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp.

MATERIAL E MÉTODO

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*.

4.2.2 – MICRORGANISMO

Para o método microbiológico foram utilizadas amostras reativadas de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923. A viabilidade foi constatada por cultivo em ágar triptona soja (TSA – Oxoid Co) e coloração pelo método de Gram (KONEMAN *et al*, 1992).

4.2.3 - OBTENÇÃO DO TECIDO GRANULOMATOSO

No tecido subcutâneo do dorso de cada animal foram implantados quatro discos de esponja de PVC para a obtenção do tecido granulomatoso conforme a seguinte técnica:

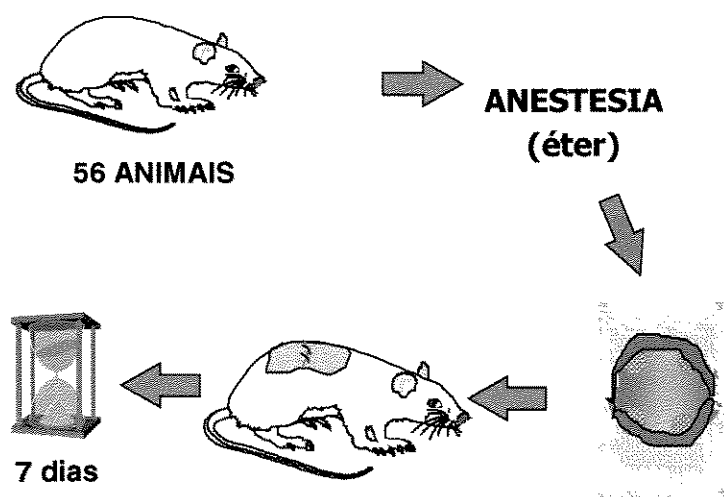
Os animais foram anestesiados pela inalação de éter etílico, em campânula de vidro. A seguir foram realizadas a tricotomia da região dorsal mediana, anti-sepsia com solução de álcool iodado a 2% e uma incisão de aproximadamente 10mm, perpendicularmente à coluna vertebral, na derme sem invasão de tecido

MATERIAL E MÉTODO

muscular, com tesoura de ponta fina. O tecido subcutâneo foi divulsionado com tesoura de ponta romba e as esponjas foram implantadas distantes da incisão, em posições laterais à esquerda e à direita, 2 em direção à cabeça e 2 em direção à cauda. A incisão foi suturada com dois pontos simples utilizando fio de algodão número zero (Figura 1).

Figura 1

IMPLANTE DAS ESPONJAS



4.2.4 – ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS

Decorridos sete dias da implantação das esponjas, os animais foram separados em 7 grupos (n=8), que receberam os seguintes tratamentos, via intragástrica e sem jejum:

MATERIAL E MÉTODO

Grupo 1 - Suspensão de amoxicilina na dose de 25mg/Kg de peso.

Grupo 2 - Solução de diclofenaco sódico na dose de 2,5mg/Kg de peso.

Grupo 3 - Solução de betametasona na dose de 0,1mg/Kg de peso.

Grupo 4 - Solução de diclofenaco sódico na dose de 2,5mg/Kg de peso associada à suspensão de amoxicilina na dose de 25mg/Kg de peso.

Grupo 5 - Solução de betametasona na dose de 0,1mg/Kg de peso associada à suspensão de amoxicilina na dose de 25mg/Kg de peso.

Grupo 6 - Solução de diclofenaco sódico na dose de 2,5mg/Kg de peso associada à solução de betametasona na dose de 0,1mg/Kg de peso.

Grupo 7 (controle) - Os animais desse grupo receberam 1,0mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%.

Todas as administrações foram feitas uma hora e meia antes da retirada dos tecidos granulomatosos. As drogas foram administradas em dose única, com o auxílio de uma seringa de 1,0mL com agulha curva (Arkansas) 70x15, para administração intragástrica, acoplada.

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

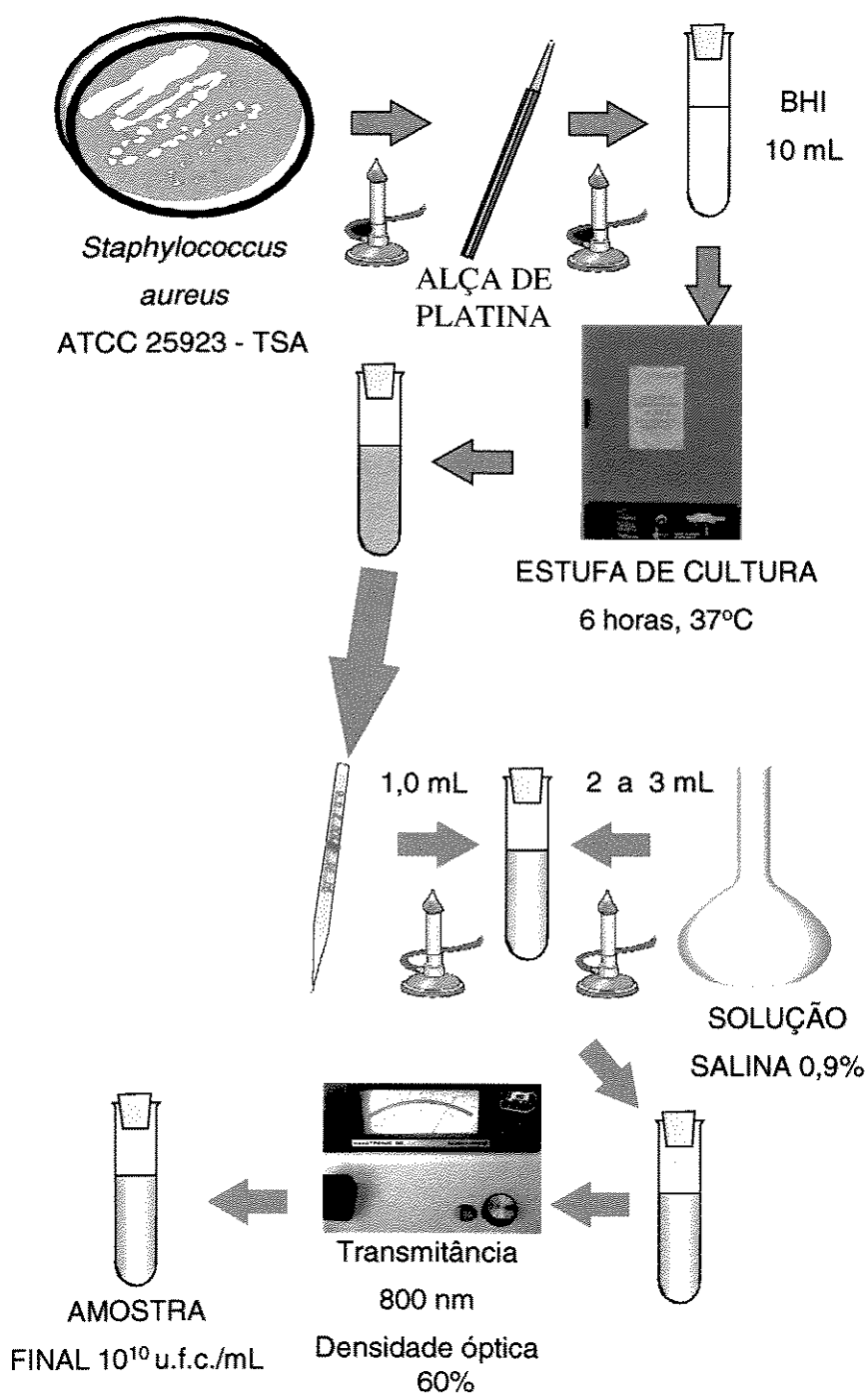
Com auxílio de alça de platina esterilizada foi colhida uma alçada de colônias de *S. aureus* cultivadas em TSA inclinado. A alçada foi transferida para tubo de ensaio contendo 10mL de BHI, incubada e mantida em estufa de cultura a 37°C por 6 horas, para atingir a fase de crescimento exponencial. Após a incubação, 1mL 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 (Spetronic 20[®] - Baush & Lomb) previamente zerado com BHI e ajustado para comprimento de onda de 800 nm. A seguir, foi transferido 1,0mL do inóculo ajustado para 99mL 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 (22mL para cada placa). As placas de Petri foram mantidas em repouso por 15 minutos para solidificação do meio de cultura à temperatura ambiente. Em seguida foram colocados os materiais em teste na superfície do meio de cultura solidificado (Figura 2).

MATERIAL E MÉTODO

Figura 2

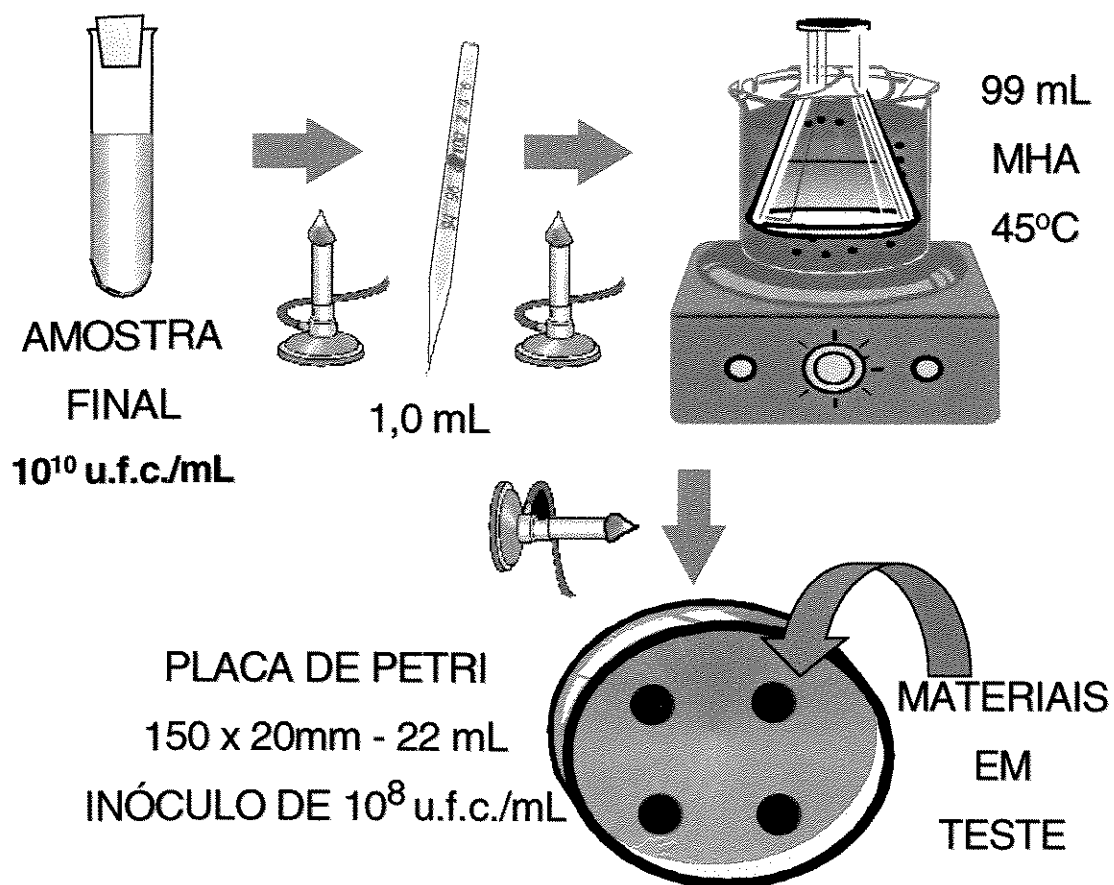
OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 10^8 u.f.c./mL



MATERIAL E MÉTODO

Figura 2 (continuação)

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



4.2.6 – OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO

A curva padrão, ou de regressão, foi elaborada para relacionar os diâmetros dos halos produzidos pelas amostras e a concentração do antimicrobiano em estudo. Foram utilizados discos de papel contendo as concentrações de 0,0200, 0,0350, 0,0700, 0,1562, 0,3125, 0,6250, 1,2500, 2,5000, 5,0000 e 10,0000 µg do antimicrobiano. Após a secagem em estufa a 37°C por uma hora, os discos foram dispostos na superfície das placas contendo MHA inoculado com 10⁸ u.f.c./mL de *S. aureus* ATCC 25923.

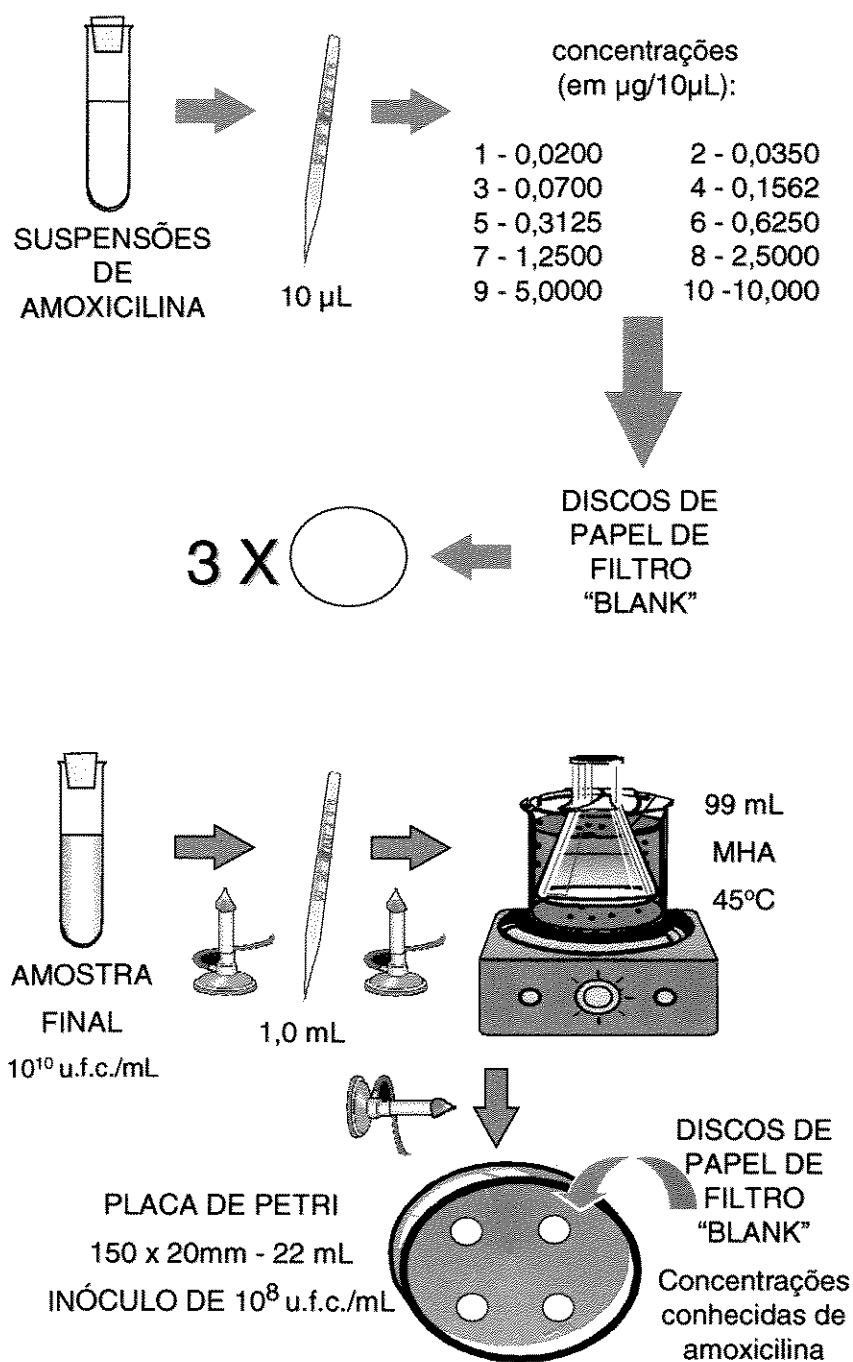
Em cada placa foram dispostos quatro discos, sendo utilizadas três placas para cada concentração. Desta forma, foram obtidos três valores de halo de inibição para cada concentração.

As placas foram levadas à estufa a 37°C por 18 horas. A seguir, os halos de inibição foram medidos com régua e as médias obtidas inseridas em programa de computador (Excel for Windows[®], versão 7.0 - Microsoft Co., licença nº 0494-59200 BR), que gerou uma curva, com valor de R-quadrado (R²) e a sua equação (diâmetro de halo de inibição em função da concentração que o originou).

(Figura 3).

Figura 3

OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO



4.2.7 - AMOSTRAS DE SANGUE E TECIDO GRANULOMATOSO

As amostras foram retiradas no sétimo dia após a implantação das esponjas e 90 minutos da administração das drogas.

Sob anestesia geral por inalação de éter etílico, os animais foram sacrificados por meio da secção do plexo carotídeo onde foi colhida amostra de 5mL de sangue. A amostra foi colocada em tubos plásticos previamente autoclavados e submetida à retração do coágulo em banho-maria a 37°C. Os tubos foram centrifugados durante 10 min a 3500rpm. A seguir foram retiradas duas alíquotas de 30µL do soro sangüíneo.

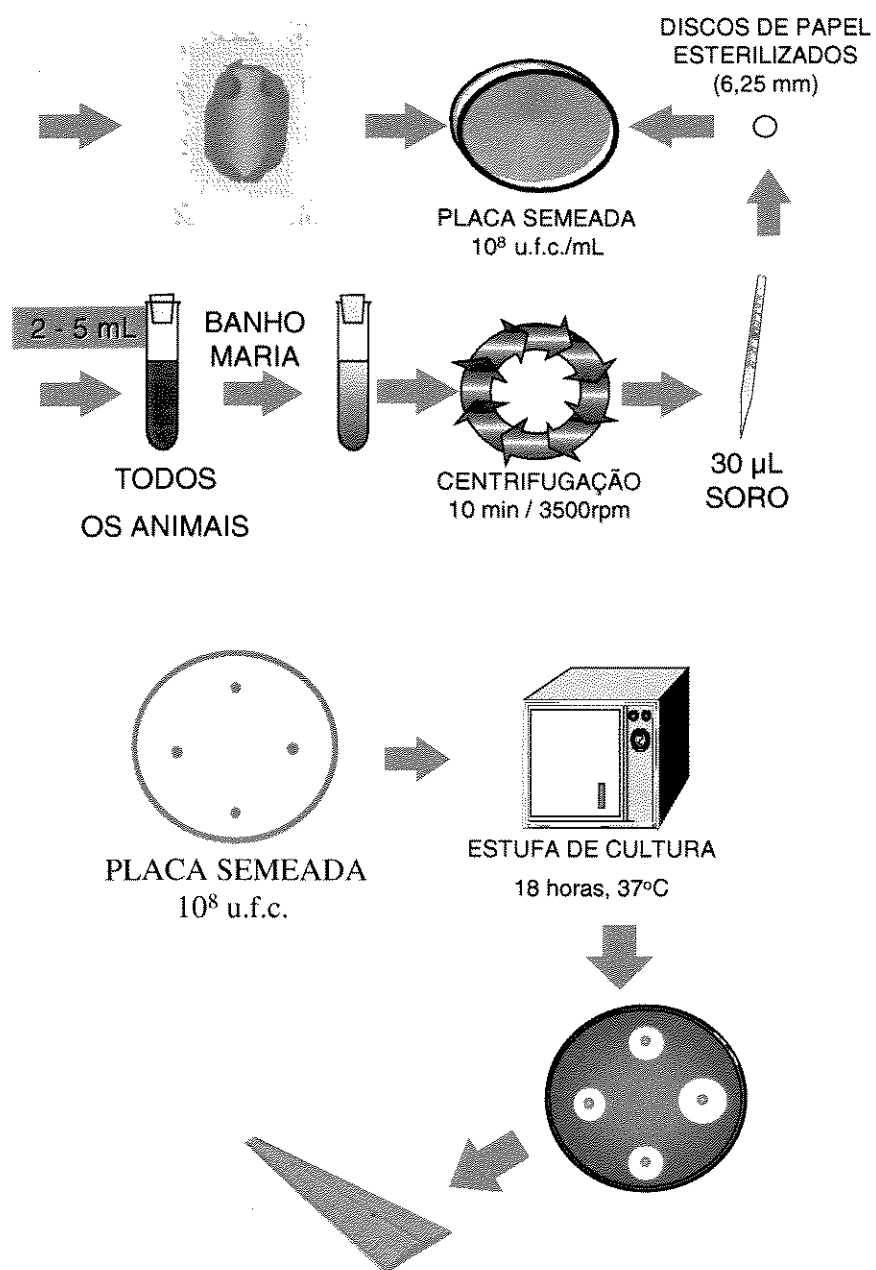
O soro foi colocado em discos de papel de filtro. Os discos foram mantidos em estufa a 37°C por 1 hora, para secagem, e após a secagem foram posicionados nas placas de Petri inoculadas, sendo então submetidos à incubação em estufa a 37°C por 18 horas. Depois da incubação, os halos de inibição formados foram medidos e os valores anotados para análise posterior.

De cada animal foram retirados dois tecidos granulomatosos. Quatro amostras, provenientes de animais diferentes, foram dispostas distantes 50mm uma da outra nas placas de Petri inoculadas e submetidas à incubação em estufa a 37°C por 18 horas (Figura 4).

MATERIAL E MÉTODO

Figura 4

AMOSTRAS DE SANGUE E TECIDO GRANULOMATOSO



MATERIAL E MÉTODO

Após a incubação foi medido com o auxílio de uma régua milimetrada o diâmetro dos halos de inibição, incluindo o tecido. As duas amostras restantes de tecido granulomatoso de cada animal foram pesadas e os valores anotados.

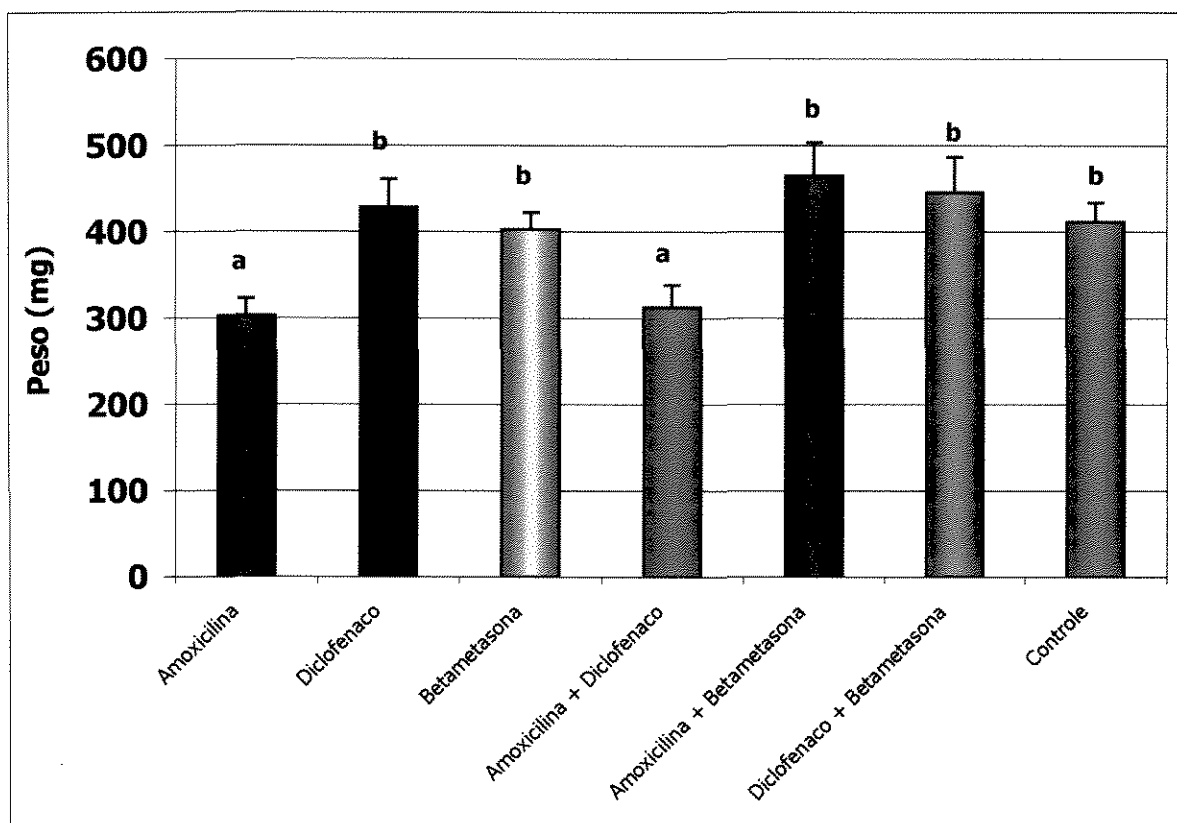
A concentração de amoxicilina foi medida substituindo-se na equação da curva de regressão os valores dos diâmetros dos halos de inibição das amostras de tecido granulomatoso e sangüíneas. Esses valores foram correlacionados com os pesos úmidos médios dos tecidos granulomatosos de cada grupo e com o volume de 30 μ L de soro sangüíneo utilizado de cada animal.

4.2.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores das concentrações séricas e teciduais calculados através da equação da curva de regressão foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%, em programa estatístico informatizado (Bioestat for Windows[®], versão 1.0 - Microsoft Co.).

5. RESULTADOS

O gráfico 1 mostra a média ($\pm$ erro padrão) do peso úmido do tecido granulomatoso formado e retirado dos animais.



Letras distintas representam diferença estatística significante.

Gráfico 1. Valores médios do peso úmido ($\pm$ erro padrão), em mg, do tecido granulomatoso formado.

RESULTADOS

As médias obtidas dos diâmetros dos halos de inibição proporcionados pelas diferentes concentrações de amoxicilina utilizadas para a obtenção da curva de regressão podem ser 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
10,000	45,0	46,0	46,0	45,67
5,0000	45,0	45,0	46,0	45,33
2,5000	41,0	42,0	42,0	41,67
1,2500	39,0	39,0	38,5	38,83
0,6250	36,0	36,5	37,0	36,50
0,3125	33,5	34,0	35,0	34,17
0,1562	33,5	31,0	31,0	31,83
0,0700	30,0	29,0	28,0	29,00
0,0350	27,0	26,0	27,0	26,67
0,0200	22,0	23,0	22,0	22,33

RESULTADOS

O gráfico 2 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).

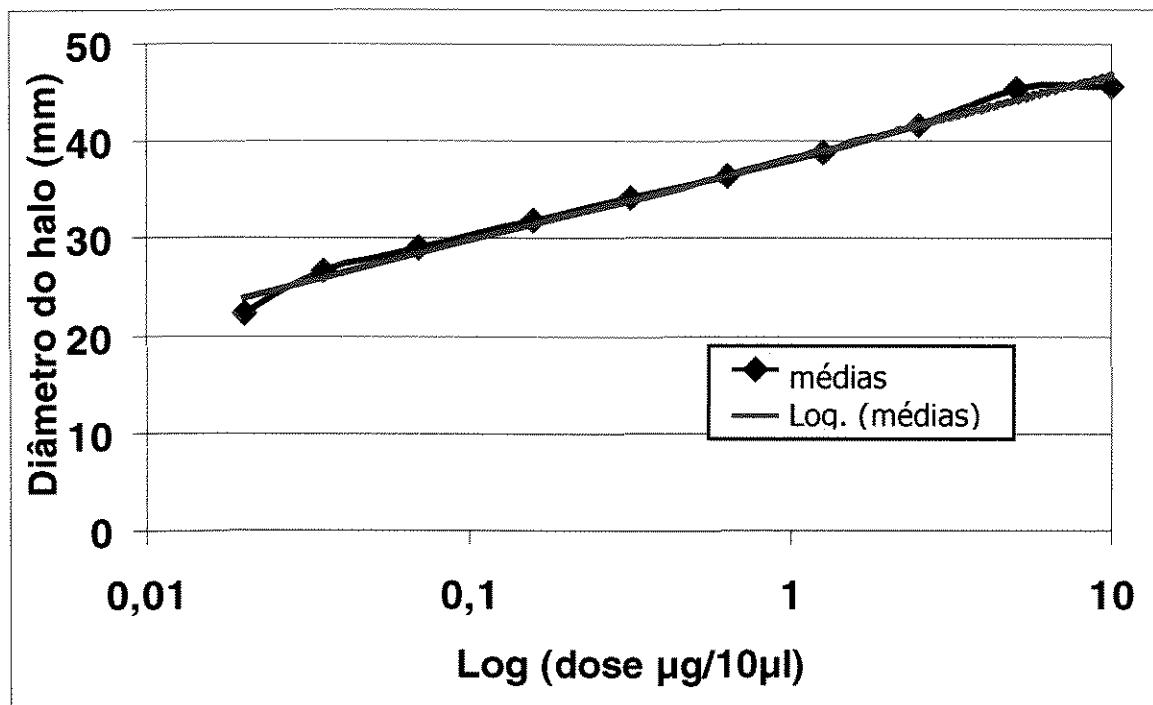


Gráfico 2. Curva padrão ou de regressão.

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) = 0,988. Esta relação é válida para diâmetros de halo de inibição entre 22,33 e 45,67mm.

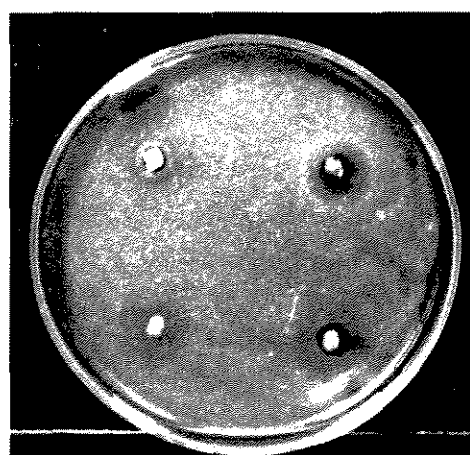
RESULTADOS

A figura 5 mostra os halos de inibição proporcionados pela amoxicilina presente nos tecidos granulomatosos dos animais do grupo 4 (amoxicilina + diclofenaco sódico) e do grupo 5 (amoxicilina + betametasona).

Figura 5. Halos de inibição obtidos com as amostras teciduais provindas dos grupos 4 e 5.



Halos de tecidos granulomatosos
(amoxicilina + betametasona)
Grupo 5

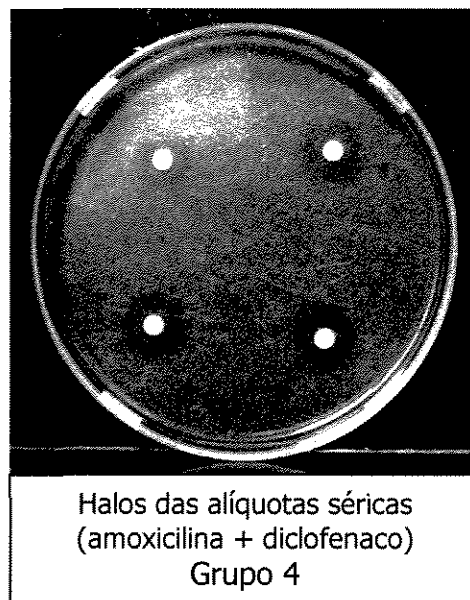


Halos de tecidos granulomatosos
(amoxicilina + diclofenaco)
Grupo 4

RESULTADOS

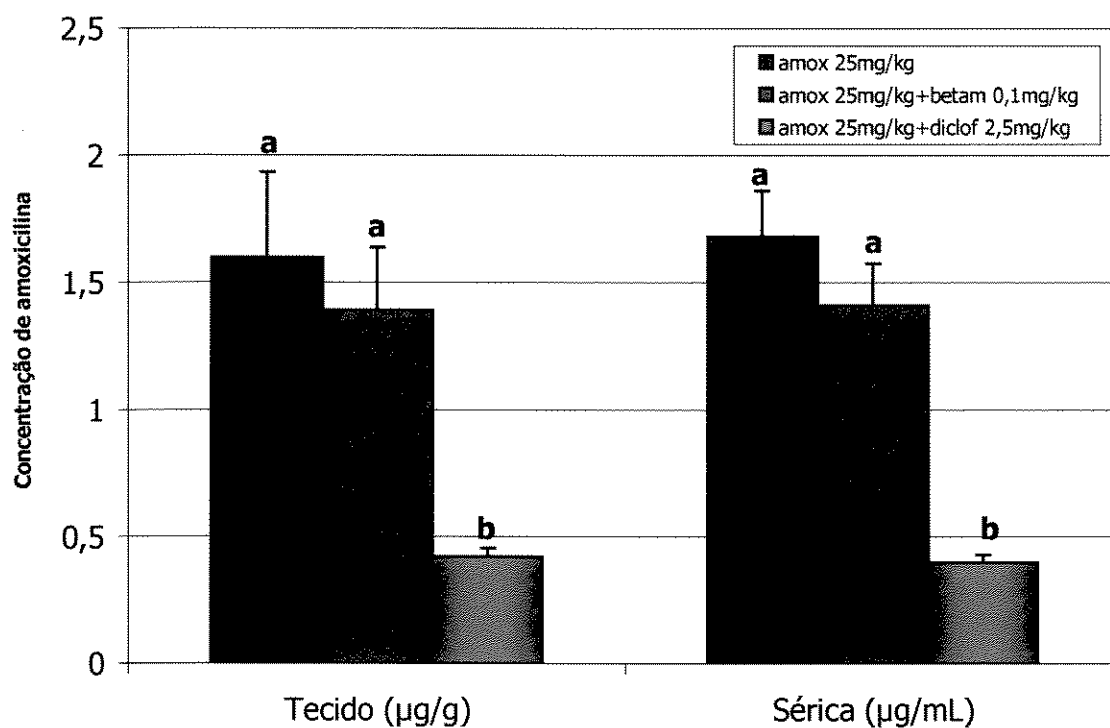
Os halos de inibição proporcionados pela amoxicilina presente no soro dos animais do grupo 4 (amoxicilina + diclofenaco sódico) e do grupo 5 (amoxicilina + betametasona) são apresentados na figura 6.

Figura 6. Halos de inibição obtidos com as amostras séricas provindas dos grupos 4 e 5.



RESULTADOS

O gráfico 3 apresenta as médias das concentrações séricas e teciduais de amoxicilina dos grupos de animais que receberam o antimicrobiano (grupos 1, 4 e 5).



Letras distintas representam diferença estatística significativa.

Gráfico 3. Representação gráfica dos valores médios das concentrações séricas, em µg/mL, e teciduais, em µg/g, de amoxicilina obtidos nos grupos tratados com este antimicrobiano.

6. DISCUSSÃO

Optou-se pelo período de 7 dias de evolução dos tecidos granulomatosos induzidos em ratos, pois de acordo com GROPPPO (1996), não há diferença estatística significativa nas concentrações de amoxicilina nesses tecidos decorridos os períodos de 7, 14, 21 e 28 dias após o implante das esponjas.

A análise estatística dos valores médios dos pesos úmidos dos tecidos granulomatosos do grupo que recebeu amoxicilina e do grupo que recebeu amoxicilina associada ao diclofenaco mostrou que os mesmos variaram significativamente para menos ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle (gráfico 1), fato este que não encontra parâmetros na literatura. Considerando que as esponjas de PVC utilizadas apresentavam o mesmo tamanho e peso e que foram implantadas sempre na mesma posição e por um único cirurgião, pode-se postular duas hipóteses para o ocorrido: a diferença encontrada é provavelmente uma resposta individual inerente ao organismo de cada animal utilizado ou a movimentação dos animais pode ter servido de estímulo para o maior desenvolvimento dos tecidos granulomatosos naqueles animais que mais se movimentaram.

Outro fator a ser considerado é que os pesos úmidos dos tecidos granulomatosos, com exceção daqueles dos grupos 1 (amoxicilina) e 4 (amoxicilina

DISCUSSÃO

+ diclofenaco), não apresentaram diferença estatística significativa. Considerando que a ação antiinflamatória do diclofenaco e da betametasona promove a diminuição da permeabilidade capilar (MORAN, 1990; FRANCO, 1995; GOODMAN & GILMAN, 1996) e, conseqüentemente, do peso do tecido, o intervalo de 90 minutos entre a administração das drogas e a retirada dos tecidos granulomatosos, provavelmente, não foi suficiente para que a ação das drogas antiinflamatórias se manifestasse.

Pode-se considerar também que a inflamação induzida nesse modelo em estudo é do tipo corpo estranho, crônica, e que os antiinflamatórios utilizados atuam no início do processo inflamatório, embora se saiba que o agente causador da reação permanece presente, estimulando o tecido constantemente. Essas considerações são relevantes por “desmistificarem” a grande importância que o Cirurgião-Dentista dá ao uso de antiinflamatório associado aos antibióticos na terapêutica de processos inflamatórios já instalados.

Embora haja referência de que o diclofenaco sódico apresenta boa ação antimicrobiana *in vitro* sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ANNADURAI, S. *et al.*, 1998), neste trabalho, nas doses empregadas nos grupos 2 (diclofenaco sódico), 3 (betametasona) e 6 (diclofenaco sódico + betametasona), não houve a formação de halos de inibição, indicando que o diclofenaco sódico e a betametasona não produziram efeito antimicrobiano sobre o *S. aureus* ATCC

DISCUSSÃO

25923, no modelo *ex-vivo*, com amostras de tecidos e sangue, em ágar. O que corrobora os resultados de SIMÕES (2000) que, utilizando-se da mesma metodologia, relatou que o diclofenaco sódico não apresentou atividade antimicrobiana frente ao mesmo microrganismo.

O fato de terem sido utilizadas esponjas esterilizadas permitiu a determinação da ação da amoxicilina, presente nos tecidos granulomatosos formados, sobre um inóculo padronizado de *S. aureus* ATCC 25923. Esse microrganismo, por sua vez, foi utilizado por já ter sido comprovada na literatura sua sensibilidade à amoxicilina (PHILIPS *et al.*, 1991; KONEMAN *et al.*, 1992). Ressalte-se que a pureza e a sensibilidade da cepa foram testadas previamente à sua utilização.

O tecido granulomatoso é caracterizado por uma coleção localizada de células epitelióides, macrófagos e linfócitos (CHATTOPADHYAY, 1994), não apresentando, portanto, barreiras para a penetração de drogas. Esta característica permitiu que a amoxicilina apresentasse, neste trabalho, concentração tecidual que refletisse aquela do soro (gráfico 4), o que está de acordo com as citações de MAZZEI *et al.* (1992), (pág. 13).

Os halos produzidos pela associação da amoxicilina com o diclofenaco indicaram redução significativa da concentração sérica e tecidual do

DISCUSSÃO

antimicrobiano, o que não ocorreu com a associação da amoxicilina com a betametasona, quando se comparou com os halos obtidos pela administração isolada da amoxicilina (gráfico 4). A concentração sérica da amoxicilina associada ao diclofenaco sódico foi de 0,42µg/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 *et al.*, 1991; KONEMAN *et al.*, 1992; GROPPPO, 1996; BAGLIE, 1998), seria de se esperar uma boa performance do fármaco frente ao patógeno, *in vivo*. Entretanto, como em processos infecciosos ricos em fibrina ou avasculares, o nível da droga é bastante inferior àquele do soro, a eficácia clínica da amoxicilina poderia ser prejudicada pela sua associação ao diclofenaco sódico, principalmente se considerarmos que o tempo de tratamento poderia ser definido como o tempo durante o qual a concentração do agente é maior do que a sua CIM frente ao patógeno no local da infecção (BARZA & WEINSTEIN, 1974). Esse fato mais uma vez ressalta que a utilização simultânea do antimicrobiano com antiinflamatórios, notadamente os não esteroidais, não tem aplicabilidade clínica tão importante, com relação à eficácia do antimicrobiano, ficando esse tipo de conduta terapêutica somente para os casos em que a própria inflamação seja causadora de grande desconforto para o paciente.

SIMÕES (2000), administrando 25mg/Kg de amoxicilina por via intragástrica associada a 2,5mg/Kg de diclofenaco sódico por via intramuscular, em ratos, obteve resultados semelhantes aos do presente trabalho em relação aos

DISCUSSÃO

níveis séricos e teciduais do antimicrobiano (gráfico 4). Com base nestes achados, poder-se-ia excluir a possibilidade de alguma interação entre os dois fármacos na fase de absorção gastrointestinal, uma vez que as drogas foram administradas por diferentes vias.

A amoxicilina apresentou, neste trabalho, distribuição sérica e tecidual proporcional. Este fato, associado a sua eliminação na forma ativa pelos rins (CROYDON & SUTHERLAND, 1970; DAJANI *et al.*, 1994) leva a inferir que o diclofenaco sódico poderia acelerar, de alguma forma, a excreção da amoxicilina afetando negativamente as concentrações séricas e teciduais do antimicrobiano.

O fato do corticosteróide betametasona não ter interferido na concentração sérica e tecidual da amoxicilina (gráfico 4) indica mais uma vantagem do uso clínico da betametasona, quando empregada em dose única (VAN DER ZWAN *et al.*, 1982; CLAMAN, 1983; HOUSHOLDER, 1985; CASHMAN & McANULTY, 1995), em relação à associação do diclofenaco sódico com o antimicrobiano.

Com respaldo na literatura (HSU & HSU, 1992; MOORE *et al.*, 1996), pode-se afirmar que o método microbiológico proporcionou mensurações com precisão suficiente para o propósito deste trabalho.

DISCUSSÃO

Finalizando, pode-se considerar que os resultados obtidos nesse trabalho são de grande relevância clínica, pois de acordo com DALHOFF & ULLMANN (1990) os parâmetros farmacocinéticos de agentes antimicrobianos se correlacionam bem com a eficácia terapêutica em modelos animais. Isso favorece a extrapolação dos resultados dessa pesquisa para a utilização dessas associações em clínica odontológica.

7. CONCLUSÕES

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

- O diclofenaco sódico diminuiu a concentração sérica e tecidual da amoxicilina quando administrado conjuntamente com o antimicrobiano, ao contrário da betametasona, que não interferiu nos mesmos parâmetros.
- Quando houver necessidade de associação da amoxicilina a um antiinflamatório, por curto período de tempo, deve-se dar preferência ao uso de betametasona em detrimento do diclofenaco sódico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, S.B.; KIERAN, O.; LEE, M. Therapy and mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and pain management, acupuncture, and rehabilitation. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v.2(3), p.473-80, 1990.

ADACHI, J.D.; BENSEN, W.G.; HODSMAN, A.B. Corticosteroid-induced osteoporosis. **Semin. Arthritis Rheum.**, v.22, p.375-84, 1993.

AMATO-NETO, V. *et al.* **Antibióticos na prática médica.** 3.ed. São Paulo: Sarvier, 1985.

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.

ANNADURAI, S. *et al.* Antibacterial activity of the anti-inflammatory agent diclofenac sodium. **Indian J. Exp. Biol.**, v.36, p.86-90, 1998.

BABIAK, L.M.; RYBAK, M.J. Hematological effects associated with betalactam use. **Drug Intell. Clin. Pharm.**, v.20, p.833-6, 1986.

BAGLIE, S. **Biodisponibilidade da amoxicilina. Estudo *ex vivo*, em ratos.** Piracicaba, 1998. 60p. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILIN, P.L.; MATKALUK, R.M. Cutaneous reactions to rheumatological drugs. **Clin. Rheum. Dis.**, v.8, p. 493, 1982.

BARNETT, M.L. Inhibition of oral contraceptive effectiveness by concurrent antibiotic administration. A review. **J. Periodontol.**, v.56, p.18-20, 1995.

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. Infect. Dis.**, v. 129, n.1, p. 59-65, 1974.

BARZA, M. A critique of animal models in antibiotic research. **Scand. J. Infect. Dis. Suppl.**, v. 14, p. 109-17, 1978.

BAUER, A.W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am. J. Clin. Path.**, v.45, p.493-6, 1966.

BIOUR, M.; BLANQUART, A.; MOORE, N. *et al.* Incidence of NSAID-related, severe gastrointestinal bleeding. **Lancet**, v.1, p.340-1, 1987.

BIRNBAUM, J.; KAHAN, F.M.; KROPP, H.; MACDONALD, J.S. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. **Am. J. Med.**, v.78(6A), p.3-21, 1985.

BLONDE, L.R.R.; TULLMAN, M.J.; REDDING, S.W. Endocrinologic disease. In: TULLMAN, M.J.; REDDING, S.W. **Systemic disease in dental treatment**, New York: Appleton-Century-Crofts, 1982.

BÖTTINGER, L.E.; FURHOFF, A.K.; HOLMER, L. Drug induced blood dyscrasias. **Acta Med. Scand.**, v.205, p.457-61, 1979.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BREZIN, J.; KATS, S.M.; SWARTZ, A.B.; CHINITZ, J.L. Reversible renal failure and nephritic syndrome associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. **N. Engl. J. Med.**, v.301, p.1271-3, 1979.

BRITISH PHARMACOPOEIA. **Her majesty's stationary office**, v. 1, p. 31-2, 1988.

BROOKS, P.M.; DAY, R.O. Non-steroidal anti-inflammatory drugs differences and similarities. **N. Engl. J. Med.**, v.324(24), p.1716-25, 1991.

CARMICHAEL, J.; SHANKEL, S.W. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on prostaglandins and renal function. **Am. J. Med.**, v.78, p.992, 1985.

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.**, v.4, n.1, p.1-12, 1985.

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

CASHMAN, J.; McANULTY, G. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in perisurgical pain management. **Drugs**, v.49, n.1, p.51-69, 1995.

CHATTOPADHYAY, A. The granulomatous response and oral cavity. **Indian J. Dent. Res.**, v. 5(1), p. 15-8, 1994.

CHEN, W.; REESE, V.A.; CHEEVER, M.A. T-cells for tumor therapy can be obtained from antigen-loaded sponge implants. **Cancer Res.**, v. 54(4), p. 1065-70, 1994.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHROUSOS, G.P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune mediated inflammation. **N. Engl. J. Med.**, v.332, p.1351-62, 1995.

CIABATTONI, G.; CINOTTI, G.A.; PIERUCCI, A. *et al.* Effects of sulindac and ibuprofen in patients with chronic glomerular disease. Evidence for the dependence of renal function on prostacyclin. **N. Engl. J. Med.**, v.310, p.279-83, 1984.

CLAMAN, H.N. Glucocorticoids I: anti-inflammatory mechanisms. **Hosp. Pract.**, v. 18, n.7, p. 123-44, 1983.

CLIVE, D.M.; STOFFI, J.S. Renal syndromes associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. **N. Engl. J. Med.**, v.310, p.563-72, 1984.

COLLINS, A.J.; DU TOIT, J.A. Upper gastrointestinal findings and faecal occult blood in patients with rheumatic disease taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Br. J. Rheumatol.**, v.26, p.295-8, 1987.

CROYDON, E.A.P.; SUTHERLAND, R. Alfa-amino-p-hydroxybenzyl-penicillin (BRL 2333), a new semi synthetic penicillin: absorption and excretion in man. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.10, p.427-30, 1970.

DAJANI, A.S.; BAWDON, R.E.; BERRY, M.C. Oral amoxicillin as prophylaxis for endocarditis: what is the optimal dose? **Clin. Inf. Dis.**, v.18, n.2, p.157-60, 1994.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. 355-58, 1992.

DINARELLO, C.A. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor in systemic responses to infection and inflammation. In: **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. ed.2, New York: Raven Press, 1992.

EBERT, R.H.; GRANT, L. The experimental approach to the study of inflammation. In: **The inflammatory processes**. ed.2, vol.1, New York: Academic Press, 1974.

FARIAS, W.W. *et al.* Sensitivity pattern of 117 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from 12 hospitals. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.43, n.3, p.199-204, 1997.

FARID, N.R.; JOHNSON, R.J.; LOW, W.T. Haemolytic reaction to mefenamic acid. **Lancet**, v.2, p.382, 1971.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nature**, v.240, p.200-3, 1972.

FERREIRA, S.H. A classification of peripheral analgesics based upon their mode of action. In: **Migraine: spectrum of ideas**. London: Oxford University Press, p.59-72, 1990.

FERREIRA, S.H.; MONCADA, S.; VANE, J.R. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. **Nature**, v.231, p.237-9, 1971.

FONSECA, A.L. **Antibióticos na clínica diária**. 3.ed. Rio de Janeiro: EPUME, 1988.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FRANCO, L.M. **Determinação de bioequivalência de diferentes formulações de diclofenaco de potássio.** Campinas, 1995. 90p. Tese (Mestrado em Ciências – Área de Farmacologia) Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

FRIMAN, C.; JOHNSTON, C.; CHEW, C. Effect of diclofenac sodium, tolfeamic acid and indomethacin on the production of superoxid induced by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in normal human polymorphonuclear leucocytes. **Scand. J. Rheumatol.**, v.5, p.41-6, 1986.

GAUNT, R. Animal models in drug development: historical aspects. **Oncology**, v. 34(3), p. 94-5, 1977.

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

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 da esponja.** Piracicaba, 1984, 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

GIVENTAL, N.I.; VED'MINA, E.A.; BOGDANOVA, L.F.; VLASOVA, V. Standardization of the methods for determining microorganism sensitivity to antibiotics. Semiquantitative and quantitative evaluation of the results of the diffusion test. **Antibiotiki**, v.25(6), p.420-4, 1980.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **The Pharmacological Basis of Therapeutics.** 9. ed. New York: Pergamon Press Inc., 1996.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GRINDLAY, J.H.; WAUGH, J.M. Plastic sponge with acts as a framework for living tissue. **Archs. Surg.**, v.6, p.288-293, 1951.

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.

GROPPO, F.C.; MATTOS-FILHO, T.R.; DEL-FIOL, F.S. Bioassay of amoxicillin in rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 23(9), p. 1033-5, 2000.

HASKETT, R.F. Diagnostic categorization of psychiatric disturbance in Cushing's syndrome. **Am. J. Psychiatry**, v.142, p.911-16, 1985.

HEIMPEL, H.; HEIT, W. Drug induced aplastic anemia. Clinical aspects. **Clin. Haematol.**, v.9, p.641-62, 1980.

HOUSHOLDER, G.T. Intolerance to aspirin and the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.43, p.333-7, 1985.

HSU, M.C.; HSU, P.W. High-performance liquid chromatographic method for potency determination of amoxicillin in commercial preparations and for stability studies. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, n.6, p. 1276-79, 1992.

JICK, H. Effects of aspirin and acetaminophen in gastrointestinal hemorrhage. **Arch. Inter. Med.**, v.141, p.316-21, 1981.

KAMIYA, Y. Experiences and studies on antimicrobial resistance in Japan: useful lessons for developing countries. **East Afr. Med. J.**, v.74, n.3, p.174-6, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KARLOWSKY, J.; FERGUSON, J.; ZHANEL, G. A review of commonly prescribed oral antibiotics in general dentistry. **J. Can. Dent. Ass.**, v.59, n.3, p.292-4, 1993.

KONEMAN, E.W. *et al.* **Introduction to diagnostic microbiology**. 2.ed. Philadelphia: J.B Lippincott Company, 1992.

KORNBERG, A.; RACHMILEWITZ, E.A. Aplastic anemia prolonged ingestion of indomethacin. **Acta Haematol.**, v.67, p.136-8, 1982.

KOROLKOVAS, A. **Análise farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.

KU, E.C. *et al.* The effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. **Am. J. Med.**, v.80, p.18-23, 1986.

LANZA, F.L.; ROYER, G.L. Jr.; NELSON, R.S. *et al.* A comparative endoscopic evaluation of the damaging effects of non-steroidal anti-inflammatory agents on the gastric and duodenal mucosa. **Ann. J. Gastroenterol.**, v.75, p.17, 1981.

LEE, S.H.; FAWLETT, V.; PREECE, J.M. Aplastic anemia associated with piroxicam. **Lancet**, v.1, p.1186, 1982.

LUND, H. Drug information from the producers. **Tidsskr. Nor. Laegeforen**, v.121(5), p.550, 2001.

MANGELSDORF, D.J.; UMESONO, K.; EVANS, R.M. The retinoide receptors. In: SPORN, M.G.; ROBERTS, A.B.; GOODMAN, D.S. **The retinoids: biology, chemistry, and medicine**, 2nd. ed., p. 319-49, New York: Raven Press, 1994.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

MAZZEI, T.; NOVELLI, A.; MINI, E.; PERITI, P. Plasma and tissue antibiotic concentrations: what is their prognostic value? **Ann. Ital. Méd. Int.**, v. 7(3 Suppl.), p. 67S-73S, 1992.

MCCARTNEY, A.C. Changing trends in infective endocarditis. **J. Clin. Path.**, v.45, n.11, p.945-8, 1992.

MCGOWAN, J.E. Jr.; CHESNEY, P.J.; CROSSLEY, K.B.; LAFORCE, F.M. Guidelines for the use of systemic glucocorticosteroids in the management of selected infections. **J. Infect. Dis.**, v.165, p.1-13, 1992.

McKINNEY, R.V. Jr. Clarification of the terms granulomatous and granulation tissue. **J. Oral Pathol.**, v.10(5), p.307-10, 1981.

MINTA, J.O.; WILLIAMS, M.D. Some nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the generation of superoxide anions by activated polymorphs by blocking leant-receptor interactions. **J. Rheumatol.**, v.12, p.751-7, 1985.

MONCADA, S.; FERREIRA, S.H.; VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin biosynthesis as the mechanism of analgesia of aspirin-like drugs in the dog knee-joint. **Eur. J. Pharmacol.**, v.31, p.250-60, 1975.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MONTGOMERY, E.H. Antibióticos antibacterianos. In: NEIDLE, E.A.; YAGIELA, J.A.; DOWD, F.J. **Farmacologia e terapêutica para dentistas**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.412-46, 1991.

MOORE, T.D. *et al.* Stability of amoxicillin-clavulanate in bacterial medium determined by high-performance liquid chromatography and bioassay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n.5, p. 1321-22, 1996.

MORAN, M. An observer-blind comparison of diclofenac potassium, piroxicam and placebo in the treatment of ankle sprains. **Curr. Med. Res. Opin.**, v.12, p.268-74, 1990.

MYERS, R.F.; SIEGEL, M.I. Differential effects of anti-inflammatory drugs on lipoxygenase and ciclo-oxygenase activities of neutrophils from a reverse passive Arthur's reaction. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.112, p.586-94, 1983.

NAPPI, G.; MANZONI, G.C. **Manuale delle cefalee**. Milano: Cluster Press, 1990.

NATHWANI, D.; WOOD, M.J. Penicillins. A current review of their clinical pharmacology and therapeutic use. **Drugs**, v.45(6), p.866-94, 1993.

NEIDLE, E.A.; YAGIELA, J.A.; DOWD, F.J. **Pharmacology and Therapeutics for Dentistry**. 4. ed. St Louis: Mosby-Year Book Inc., 1998.

NEU, H.C.; WINSHELL, E.B. Pharmacological studies of 6[d(-) a-amino-p-hydroxyphenylacetamido] penicillanic acid in humans. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.10, p.423-6, 1970.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PEREZ, H.D.; ELFMAN, F.; MARDER, S. Meclofenamate sodium monohydrate inhibits chemotactic factor-induced human polymorphonuclear leukocyte function. A possible explanation for its anti-inflammatory effect. **Arthritis rheum.**, v.30, p.1023-31, 1987.

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, 1998.

PETERSEN, M.C.; NATION, R.L.; McBRIDE, W.G.; ASHLEY, J.J.; MOORE, R.G. Pharmacokinetics of betamethasone in healthy adults after intravenous administration. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v.25(5), p.643-50, 1983.

PHILIPS, I. *et al.* A guide to sensitivity testing. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.27, p.1-50, 1991.

PIDDOCK, L.J.V. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. **J. Appl. Bact.**, v.68, n.4, p.307-18, 1990.

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.

PILKS, S.J.; GRANNER, D.K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annu. Rev. physiol.**, v.54, p.885-902, 1992.

PIPER, J.M. *et al.* Corticosteroid use and peptic ulcer disease: role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Ann. Intern. Med.**, v.114, p.735-40, 1991.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PIPITONE, V. I farmaci antiflogistici non steroidei. **Riv. Medico Pratico-Reumatol.**, v.5, p.55, 1988.

POHUNKOVA, H.; STEHLIK, J.; VACHAL, J.; CECHE, O.; ADAM, M. Morphological features of bone healing under the effect of collagen-graft-glycosaminoglycan copolymer supplemented with the tripeptide Gly-His-Lys. **Biomaterials**, v. 17(16), p. 1567-74, 1996.

PRADO, F.C.; RAMOS, J.; VALLE, J.R. **Atualização Terapêutica 2001**. São Paulo: Artes Médicas, 2001.

REICHLIN, S. Neuroendocrine-immune interactions. **N. Engl. J. Med.**, v.329, p.1246-53, 1993.

RENNEBERG, J.; WALDER, M. A mouse model for simultaneous pharmacokinetic and efficacy studies of antibiotics at sites of infection. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.22, p.51-60, 1988.

ROMAN, R.S. *et al.* Rapid geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. **Clin. Infect. Dis.**, v.25, n.3, p.698-705, 1997.

ROTH, S.H. Non steroidal anti-inflammatory drug gastropathy. **Arch. Intern. Med.**, v.146, p.1075-6, 1986.

SAATCIOGLU, F.; CLARET, F.X.; KARIN, M. Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. **Semin. Cancer Biol.**, v.5, p.347-59, 1994.

SABATH, L.D. Tissue penetration of antibiotics; an overview. **Scand. J. Infect. Dis. Suppl.**, v. 14, p. 313-5, 1978.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SANDERS, C.C.; SANDERS W.E. Jr. β -Lactam resistance in gram negative bacteria: global trends and clinical impact. **Clin. Infect. Dis.**, v.15, p.824-39, 1992.

SIEGEL, M.I.; McCONNEL; PORTER, N.A. Aspirin-like drugs inhibit arachdonic acid metabolism via lipoxxygenase and ciclo-oxygenase in rat neutrophils from carragenin pleural exudates. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.92, p.688, 1980.

SILVOSO, G.R.; IVEY, K.J.; BUTT, J.H. *et al.* Incidence of gastric lesions in patients with rheumatic disease on chronic aspirin therapy. **Ann. Inter. Med.**, v.91, p.517-20, 1979.

SIMÕES, R.P. **Efeito do diclofenaco sódico sobre a concentração sérica e tecidual da amoxicilina e sobre infecção estafilocócica. Estudo *in vivo*, em ratos.** Piracicaba, 2000. 92p. Tese (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

SZCZEKLIK, A. Anti-cyclo-oxygenase agents and asthma. **J. Asthma**, v.20 (Suppl 1), p.23-9, 1983.

TIENGO, C. I Fans, In: TIENGO, M.; BENEDETTI, C. **Fisiopatologia e terapia del dolore.** Paris: Masson, p.149-63, 1996.

TIENGO, M.; HUNGARO, R.; SALAFFI, F. **II dolore: aspetti diagnostici e terapeutici.** Milano: Fogliazza, 1989.

TODD, P.A.; SORKIN, E.M. Diclofenac sodium: a reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, therapeutic efficacy. **Drugs**, v.35, p.244-285, 1988.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **Eur. J. Pharmacol.** v.251, p.173-9, 1994.

UNITED STATES PHARMACOPEIA XXII. The national formulary XVII, Rockville, p. 80-4, 1990.

VALLIEN, G.; LANGLEY, R.; JENNINGS, S.; SPECIAN, R.; GRANGER, D.N. Expression of endothelial cell adhesion molecules in neovascularized tissue. **Microcirculation**, v. 7(4), p. 249-58, 2000.

VAN DER ZWAN, J. *et al.* The lower third molar and antiphlogistics. **Int. J. Oral Surg.**, v.11, n.6, p.340-50, 1982.

VIZIOLI, M.R. Dynamics of fibrillar components in rat sponge induced granulation tissue. **Acta anat.**, v.85. n.3, p.358-77, 1973.

WEHLING, M. Novel aldosterone receptors: specificity conferring mechanism at the level of the cell membrane. **Steroids**, v.59, p.160-3, 1994.

ZAK, O.; O'REILLY, T. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 35, n.8, p. 1527-31, 1991.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1

Tabela 2. Diâmetros, em mm, dos halos de inibição obtidos das amostras teciduais de cada animal (grupos 1, 4 e 5) e suas médias.

GRUPOS DE ANIMAIS	DIÂMETRO DO HALO TEC. GRANULOMAT 1	DIÂMETRO DO HALO TEC. GRANULOMAT 2	MÉDIA HALOS DE TEC. GRANULOMAT
GRUPO 1 (AMOXICILINA)	24,5	27,0	25,75
	26,5	23,0	24,75
	24,0	25,5	24,75
	24,0	27,0	25,50
	22,5	25,0	23,75
	31,0	31,0	31,00
	22,0	24,0	23,00
	25,0	26,0	25,50
MÉDIA DO GRUPO 1			25,50
GRUPO 4 (AMOXICILINA + DICLOFENACO SÓDICO)	22,0	22,0	22,00
	24,0	23,0	23,50
	22,0	22,0	22,00
	19,0	19,0	19,00
	22,0	22,0	22,00
	19,0	23,0	21,00
	19,0	22,0	20,50
	22,0	21,0	21,50
MÉDIA DO GRUPO 4			21,44
GRUPO 5 (AMOXICILINA + BETAMETASONA)	25,5	25,0	25,25
	28,0	28,0	28,00
	27,0	23,0	25,00
	26,0	27,0	26,50
	22,0	25,0	23,50
	26,0	25,0	25,50
	31,0	32,0	31,50
	28,0	28,5	28,25
MÉDIA DO GRUPO 5			26,69

ANEXO 2

Tabela 3. Diâmetros, em mm, dos halos de inibição obtidos das alíquotas séricas de cada animal (grupos 1, 4 e 5) e suas médias.

GRUPOS DE ANIMAIS	DIÂMETRO DO HALO ALÍQUOTA 1 (SORO)	DIÂMETRO DO HALO ALÍQUOTA 2 (SORO)	MÉDIA DOS HALOS DO SORO
GRUPO 1 (AMOXICILINA)	25,5	25,0	25,25
	25,5	26,0	25,75
	26,5	26,5	26,50
	25,5	26,0	25,75
	26,5	27,0	26,75
	29,0	30,0	29,50
	25,0	25,0	25,00
	26,0	27,0	26,50
MÉDIA DO GRUPO 1			26,38
GRUPO 4 (AMOXICILINA + DICLOFENACO SÓDICO)	21,0	22,0	21,50
	21,0	21,0	21,00
	19,0	19,0	19,00
	22,0	21,0	21,50
	23,0	23,0	23,00
	22,0	22,0	22,00
	21,0	20,0	20,50
	22,0	20,0	21,00
MÉDIA DO GRUPO 4			21,19
GRUPO 5 (AMOXICILINA + BETAMETASONA)	25,5	25,0	25,25
	22,0	23,0	22,50
	23,5	23,0	23,25
	26,0	25,5	25,75
	26,0	25,5	25,75
	25,0	25,5	25,25
	28,5	28,0	28,25
	28,0	28,5	28,25
MÉDIA DO GRUPO 5			25,53

ANEXO 3

Tabela 4. Valores da concentração tecidual e sérica de amoxicilina (em $\mu\text{g/g}$) do grupo 1 (amoxicilina) e suas médias.

Animal	Amoxicilina ($\mu\text{g/g}$)			
	Tecido gran 1	Tecido gran 2	Soro 1	Soro 2
1	0,933	1,821	1,377	1,229
2	1,593	0,624	1,109	1,229
3	0,816	1,219	1,018	1,606
4	0,816	1,821	1,319	1,229
5	0,546	1,066	0,806	1,606
6	5,314	5,314	5,314	3,137
7	0,478	0,816	0,647	1,075
8	1,066	1,394	1,230	1,405
Média	1,445	1,759	1,603	1,565
Média do grupo		1,602		1,584

ANEXO 4

Tabela 5. Valores da concentração tecidual e sérica de amoxicilina (em $\mu\text{g/g}$) do grupo 5 (amoxicilina + betametasona) e suas médias.

Animal	Amoxicilina ($\mu\text{g/g}$)			
	Tecido gran 1	Tecido gran 2	Soro 1	Soro 2
1	0,793	0,694	0,744	1,229
2	1,548	1,548	1,548	0,482
3	1,185	0,406	0,796	0,720
4	0,907	1,185	1,046	1,405
5	0,311	0,694	0,503	1,405
6	0,907	0,694	0,801	1,075
7	3,457	4,518	3,988	2,744
8	1,548	1,770	1,659	2,400
Média	1,332	1,439	1,386	1,433
Média do grupo		1,385		1,409

ANEXO 5

Tabela 6. Valores da concentração tecidual e sérica de amoxicilina (em $\mu\text{g/g}$) do grupo 4 (amoxicilina + diclofenaco sódico) e suas médias.

Animal	Amoxicilina ($\mu\text{g/g}$)			
	Tecido gran 1	Tecido gran 1	Soro 1	Soro 2
1	0,790	0,604	0,697	0,368
2	0,462	0,462	0,462	0,216
3	0,207	0,207	0,207	0,482
4	0,462	0,462	0,462	0,629
5	0,207	0,604	0,406	0,482
6	0,207	0,462	0,335	0,368
7	0,462	0,354	0,408	0,482
8	0,366	0,432	0,399	0,407
Média	0,395	0,448	0,422	0,429
Média do grupo		0,421		0,425