



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



# **CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Monografia de Final de Curso

**Aluno:** Gustavo Sueitt Braga Leite

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

**Ano de Conclusão do Curso:** 2004

**Gustavo Sueitt Braga Leite**

**DOSAGEM DE METRONIDAZOL EM SALIVA POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA**

Monografia apresentada ao curso de  
Odontologia da Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba – FOP/ Unicamp, para obtenção  
do Diploma de Cirurgião-Dentista

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

**Piracicaba  
2004**

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

**Dedico este trabalho aos meus pais, ao Rodrigo e à minha namorada Michelle,  
que me apoiaram muito durante todos esses anos de graduação,  
principalmente nos momentos mais difíceis.**

## **AGRADECIMENTOS**

**Ao Prof. Dr. Francisco, pela atenção e  
habilidade em me orientar durante este  
trabalho.**

**Aos meus companheiros de laboratório  
Rogério e Juliana, que sempre me  
ajudaram durante todo o  
desenvolvimento do projeto.**

# SUMÁRIO

Lista de Tabelas .....	6
Resumo.....	8
Introdução .....	10
Matérias e Métodos .....	14
Resultados .....	16
Considerações Finais .....	27
Referências Bibliográficas .....	28

## **LISTAS DE TABELAS**

Tabela 1- Tratamentos para periodontite crônica preconizado pela literatura.....	11
Tabela 2 – Áreas dos picos cromatográficos após o período de 30 dias.....	22

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cromatograma obtido após extração com o método 3.....	16
Figura 2 - Cromatogramas sobrepostos referentes às variações realizadas (fluxo, tempo de corrida, métodos de extração e fase móvel).....	18
Figura 3 - Cromatogramas sobrepostos para elaboração da curva de calibração .....	20
Figura 4 - Equação da reta da curva de calibração.....	21
Figura 5 - Equação de reta obtida com os resultados referentes à armazenagem em refrigerador por 30 dias. ....	23
Figura 6 - Cromatogramas sobrepostos referentes às diferentes concentrações de metronidazol armazenadas em refrigerador por 30 dias. ....	24
Figura 7 - Equação de reta obtida com os resultados referentes à armazenagem em freezer comum (-20°C) por 30 dias. ....	24
Figura 8 - Cromatogramas sobrepostos referentes às diferentes concentrações de metronidazol armazenadas em freezer comum (-20°C) por 30 dias.....	25
Figura 9 - Equação de reta obtida com os resultados referentes à armazenagem em freezer (-70° C) por 30 dias. ....	25
Figura 10 - Cromatogramas sobrepostos referentes às diferentes concentrações de metronidazol armazenadas em freeze (-70°C) por 30 dias. ....	26

## RESUMO

O metronidazol (MTZ) é um antibiótico do grupo nitroimidazol que tem ação contra protozoários e bactérias anaeróbicas, tanto Gram-positivas quanto negativas.

Este antibiótico vem sendo cada vez mais prescrito em Odontologia no tratamento de doenças como gengivite necrosante e ulcerativa, periodontites destrutivas e periodontites crônicas.

A efetividade de um agente antimicrobiano depende da sua concentração e permanência no sítio de ação. A dosagem da concentração do MTZ no fluido gengival poderia estabelecer a melhor dosagem para o tratamento odontológico.

Como já demonstrado em alguns estudos, a concentração do MTZ na saliva é proporcional aos níveis sanguíneos, sendo assim, a medição de suas concentrações na saliva pode ser usada como um método seguro e conveniente em estudos farmacocinéticos e de bioequivalência.

Para a medição de níveis de fármacos na saliva, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) tem sido um dos métodos mais precisos e utilizados. No entanto, não existem relatos na literatura que mensurem concentrações de MTZ muito baixas em pequenas quantidades de saliva.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma padronização da metodologia de detecção do MTZ visando estudos in vivo. Assim foram avaliados os efeitos da extração e centrifugação das amostras, do pH salivar, da composição da fase móvel, da temperatura de estocagem e do tempo de estocagem sobre a concentração salivar do MTZ.

A partir dos resultados obtidos, foi concluído que o método proposto demonstrou resultados com linearidade, precisão e eficácia. Além disso, os

parâmetros avaliados: extração, centrifugação, pH salivar e fase móvel demonstraram uma influência direta na quantificação do metronidazol, e o armazenamento a  $-70^{\circ}\text{C}$  foi o que demonstrou maior estabilidade para amostras de salivas com metronidazol.

## INTRODUÇÃO

O metronidazol (MTZ) é um antibiótico do grupo nitroimidazol que tem ação contra os protozoários e bactérias anaeróbicas, tanto Gram positivas quanto negativas. É completamente e imediatamente absorvido por via oral, sendo que uma dose de 500mg produz um pico no plasma de concentração de 10 µg/mL em uma hora. Sua principal via de metabolização é a hepática, com somente 10% de excreção na urina. Possui baixa ligação plasmática (11%) e meia vida de  $8.5 \pm 2.9$  horas. A dose geralmente usada para o tratamento de doenças causadas por protozoários é 250 mg administrada três vezes ao dia durante sete dias. Entretanto, doses acima de 2 g diários durante três dias têm sido empregadas com sucesso, sem apresentar toxicidade (TRACY & WEBSTER, 2001).

Na verdade, raros são os efeitos colaterais e, normalmente, estes não inviabilizam a terapia (LAU *et al.*, 1992; ROE, 1977). Os efeitos colaterais mais encontrados são: cefaléia, náuseas, xerostomia e paladar metalizado. Entretanto, vômitos, diarréias e cólicas abdominais já foram relatados. O medicamento é contra-indicado para pacientes portadores de distúrbios neurológicos devido à possibilidade de neuro-intoxicação. Embora o MTZ tenha sido usado em todos os estágios de gravidez, nos primeiros três meses deve ser evitado. Em indivíduos com distúrbios renais e hepáticos ou naqueles que são utilizam fármacos que tenham metabolismo hepático o fármaco deve ser evitado.

LAU *et al.* (1992) demonstraram que o MTZ tem efeito carcinogênico em roedores e mutagênico em bactérias. No entanto, TRACY & WEBSTER (2001) não encontraram evidências de que doses terapêuticas tenham causado aumento significativo no risco de câncer em humanos.

O uso do MTZ tem sido cada vez mais freqüente na odontologia no tratamento de infecções anaeróbicas o que justifica sua importância terapêutica. Tem ação sobre microorganismos anaeróbios estritos e tem sido usado com sucesso no tratamento de gengivite necrosante e ulcerativa (BUCHMANN *et al.*, 2002), periodontites destrutivas (BODUR *et al.*, 2001) e periodontites crônicas (FERES *et al.*, 2001).

BUCHMANN *et al.* (2002) estudaram 13 voluntários que apresentavam periodontite agressiva e concluíram que a associação da intervenção cirúrgica e o MTZ foi um método eficiente de tratamento, com 95% de regressão da periodontite.

Quando associado à outros medicamentos, como à amoxicilina por exemplo, houve sucesso no tratamento de periodontites crônicas (ROONEY *et al.*, 2002).

Em associação à penicilina V, o MTZ demonstrou ser eficiente no tratamento de infecções de origem endodôntica (KHEMALEELAKUL *et al.*, 2002).

Na literatura existe uma diversidade de tratamentos para periodontite crônica, preconizando diferentes dosagens como mostra a tabela abaixo:

DOSE (mg)	FREQÜÊNCIA (vezes ao dia)	PERÍODOS	DURAÇÃO (dias)	DOSE TOTAL (g)	REFERÊNCIAS
2.000	1	1	1	2	Walsh <i>et al.</i> 1986
500	3	1	6	9	Van Oostein <i>et al.</i> 1987
500	2	1	14	14	Loesche <i>et al.</i> 1996
400	3	1	7	8.4	Soder <i>et al.</i> 1990
250	3	1	7	5.25	Loesche <i>et al.</i> 1984, 1992, 1991; Schidt <i>et al.</i> 1988
250	3	1	5	3.75	Giedrys-Leeper <i>et al.</i> 1985
200	4	3	14	33.6	Lindhe <i>et al.</i> 1983
200	3	1	5	3	Jenkins <i>et al.</i> 1989; Joysten-Bechal <i>et al.</i> 1984, 1986
200	3	1	7	4.2	Malmood&Dolby 1987; Watts <i>et al.</i> 1986; Clark <i>et al.</i> 1983
250	3	1	14	10.5	Feres <i>et al.</i> 2000

Tabela 1: Tratamentos para periodontite crônica preconizado pela literatura

Uma vez que a efetividade de um agente antimicrobiano depende da sua concentração no sítio de ação e da sua permanência no sítio de ação, é importante

correlacionar a concentração do MTZ com sua eficácia terapêutica a fim de estabelecer a melhor dosagem para o tratamento odontológico.

A estimativa farmacocinética das drogas é normalmente baseado na medição de seus níveis no sangue. Porém, para alguns fármacos, a concentração na saliva é proporcional aos níveis sanguíneos, permitindo o uso desta em estudos farmacocinéticos. Uma vantagem do uso da saliva neste tipo de estudo é que a colheita de saliva não é considerada um método invasivo.

Para a detecção de metronidazol existem diversos métodos: volumétrico, gravimétrico, polarográfico, cromatografia gasosa, TLC, HPLC, HPTLC etc. O método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC) tem sido um dos métodos mais precisos e utilizados para medição de níveis do fármaco em fluidos biológicos tais como sangue, saliva (JESSA *et al.*, 1996; MUSTOFA *et al.*, 1991; VAN OOSTEN *et al.*, 1986). Em fluido gengival não foi possível a mensuração dada a pequena quantidade de fluido e da baixa concentração relativa, sendo necessário um método com menor limite de quantificação (VAN OOSTEN *et al.*, 1986).

MUSTOFA *et al.* (1991) concluíram que a concentração de metronidazol na saliva é proporcional em correlação aos seus níveis sanguíneos e que a medição de suas concentrações na saliva pode ser usada como um método seguro e conveniente em estudos farmacocinéticos e de bioequivalência.

Embora existam três métodos de dosagem do metronidazol em saliva, através de cromatografia líquida 5na literatura (JESSA *et al.*, 1996; MUSTOFA *et al.*, 1991; VAN OOSTEN *et al.*, 1986), o limite de detecção não é suficientemente baixo para detectar concentrações pequenas como as esperadas no fluido gengival e também

não existem dados a respeito dos possíveis interferentes do método sobre a concentração do MTZ em saliva.

Desta forma, o propósito deste estudo foi estabelecer uma padronização da metodologia de detecção do MTZ visando estudos *in vivo*. Assim, foram feitas análises dos efeitos da extração e centrifugação das amostras, do pH salivar, da composição da fase móvel, da temperatura de estocagem e do tempo de estocagem sobre a concentração salivar do MTZ.

### **DESENVOLVIMENTO DO PROJETO**

O projeto foi enviado ao pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP (CEP) no dia 06/10/2003, para análise segundo a Resolução CNS 196/96 de 10/10/96, sendo aprovado com pendências na reunião de 05/11/2003. Após este período o CEP entrou em recesso e as modificações solicitadas foram feitas e enviadas em fevereiro/2004 para a reunião de março/2004, sendo considerado aprovado em maio/2004, com protocolo CEP nº 161/2003 (em anexo). Assim, houve um atraso significativo do cronograma até a aprovação junto ao CEP, sendo necessário alterar o mesmo. Desta forma, a dosagem do metronidazol em saliva somente foi realizada para o período de 1 mês. As amostras referentes aos períodos faltantes (3 e 6 meses), já se encontram armazenadas e serão analisadas após a expiração dos destes prazos.

Foram realizados os testes avaliando a constituição de fase móvel, armazenagem e pH das amostras e formas de extração. As variações que demonstraram os melhores resultados foram utilizadas para a dosagem final do metronidazol.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Reagentes e padrões analíticos**

Para os testes foram utilizados fosfato de potássio mono e di-básico, fosfato de sódio mono e di-básico, acetonitrila (grau HPLC), metanol (grau HPLC), ácido fosfórico, hidróxido de sódio, ácido perclórico, acetato de sódio, metronidazol (MTZ)

### **Amostras de saliva**

Uma vez que foi utilizada saliva no experimento, o estudo foi, de acordo com as normas descritas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde (CNS/MS), submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Odontologia de Piraciaba – UNICAMP (CEP/FOP). O trabalho foi aprovado com o protocolo CEP nº 161/2003 (em anexo). Após sua aprovação pelo CEP/FOP, os voluntários foram submetidos à leitura do termo de consentimento livre e esclarecido e, após a sua concordância, o mesmo foi considerado participante do estudo.

Foram colhidas amostras de saliva de 10 voluntários com o seguinte perfil:

1. Homens com idade entre 18 e 25 anos;
2. Que tenham aptidão em fornecer o termo de consentimento livre e esclarecido por escrito;
3. Não apresentem nenhuma doença sistêmica;
4. Tenham pelo menos 20 dentes;
5. Não tabagistas.

De cada voluntário foram colhidas amostras de 20 mL de saliva não-estimulada que foram depositadas em tubos para centrífuga. Um “pool” de saliva com 10 mL da amostra de cada voluntário foi obtido.

### ***Metronidazol nas amostras de saliva***

Para os ensaios de quantificação do MTZ, o "pool" de saliva sofreu adição de concentrações progressivas de ordem 2 a partir de 0,015 até 5 µg/mL (0.015, 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2.5 e 5). Para obtermos as diluições testadas, partimos de uma concentração de 50 µg/ml para melhor segurança e exatidão na pesagem do metronidazol.

### ***Efeito da extração e centrifugação sobre a concentração***

O pool de saliva contendo Metronidazol foi submetido, inicialmente, a dois processos de extração:

1 - 100 µL de saliva + 100 µL de acetonitrila, agitação em vortex por 30 s, sendo a mistura mantida por 15 min em temperatura ambiente.

2 - 100 µL de saliva + 10 µL de ácido perclórico a 20% , agitação em vortex por 15 s, sendo a mistura submetida à centrifugação a 2000 rpm durante 2 min e 150 µL do sobrenadante foi misturado com 150 µL de uma solução de acetato de sódio 1M durante 30 min.

Embora tenham sido realizadas variações de tempo de centrifugação e volume de reagentes envolvendo os dois métodos de extração propostos, os resultados obtidos com ambas as variações testadas (extração e centrifugação) foram insatisfatórios, sendo adicionado um terceiro processo de extração:

3 - 500 µL de saliva + 250 µL de ácido perclórico a 20%, agitação em vortex por 15 s, sendo a mistura submetida à centrifugação a 14000 rpm durante 15 min e 450 µL do sobrenadante foi misturado com 150 µL de uma solução para ajuste de pH.

## RESULTADOS

Os resultados foram comparados em termos de precisão e linearidade e a melhor combinação de extração e centrifugação foi adotada para a análise das amostras armazenadas. Embora o método 3 tenha sido o mais eficaz, não foi possível a desproteinização total das amostras, uma vez que ainda foram detectadas proteínas salivares durante a realização das análises, como pode ser observado na figura 1.

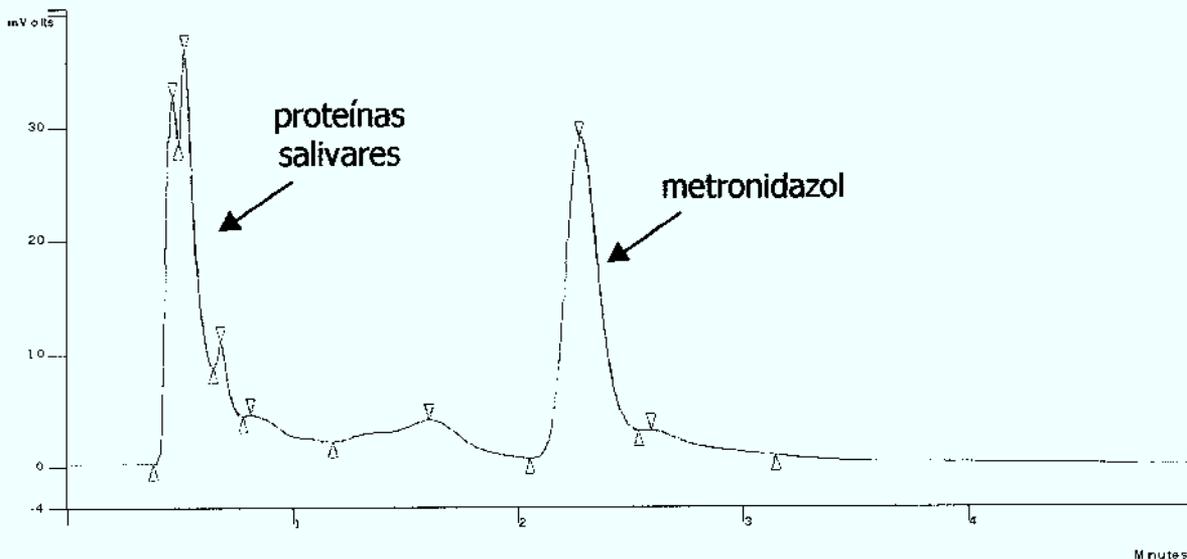


Figura 1 – Cromatograma obtido após extração com o método 3.

### ***Efeito do pH salivar sobre a concentração***

O pH das amostras foi medido e ajustado quando necessário, para 4,5, 5,5 e 6,5 através de ácido fosfórico ou hidróxido de fosfato. Após extração e centrifugação, as amostras foram injetadas (50  $\mu$ L) no sistema. Os resultados foram comparados em termos de precisão e linearidade e, diante dos resultados, o melhor pH (4,7) foi adotado para a próxima fase.

### ***Efeito da composição da fase móvel e dos parâmetros cromatográficos sobre a detecção do metronidazol***

O pH das amostras foi ajustado quando necessário e, após extração e centrifugação, as amostras foram injetadas (50 µL) no sistema. As seguintes fases móveis foram avaliadas sob as mesmas condições gerais (mesma coluna, comprimento de onda, etc):

- 1 – Tampão fosfato de potássio 0,01M (pH=4,7) e acetonitrila (80:20);
- 2 – Tampão fosfato de sódio 0,01M (pH=4,7) e acetonitrila (80:20);
- 3 – Tampão fosfato de potássio 0,01M (pH=4,7) e metanol (80:20);
- 4 – Tampão fosfato de sódio 0,01M (pH=4,7) e metanol (80:20).

Os resultados foram comparados em termos de precisão e linearidade e a melhor condição de fase móvel foi adotada para a próxima fase. Foram observados os melhores resultados utilizando-se a fase móvel 2. Entretanto, a proporção inicialmente proposta (80:20) não demonstrou resultados satisfatórios, uma vez que com maior quantidade de acetonitrila na fase móvel, o pico cromatográfico referente ao metronidazol foi detectado em um tempo de retenção menor, coincidindo com picos de proteínas salivares, e, desta forma, impossibilitando a dosagem do metronidazol, como pode ser observado na figura abaixo (Figura 2-1). A proporção de acetonitrila que demonstrou melhores resultados foi com 7% (Figura 2-3).

Quanto aos parâmetros cromatográficos, foram avaliadas as variações envolvendo tempo de corrida da amostra e fluxo (em mL/min). A diminuição da proporção de acetonitrila na fase móvel aumentou o tempo de retenção do metronidazol, impedindo assim que ocorresse a sua sobreposição com os picos referentes às proteínas salivares. Entretanto, com esta diminuição foi observado um achatamento dos picos cromatográficos, o que é impróprio para a integralização dos

resultados em cromatografia líquida (Figura 2-2). Desta forma, foi necessário o ajuste do fluxo, que, dentre as variações testadas, apresentou os melhores resultados com 1,5 mL/min (Figura 2-3).

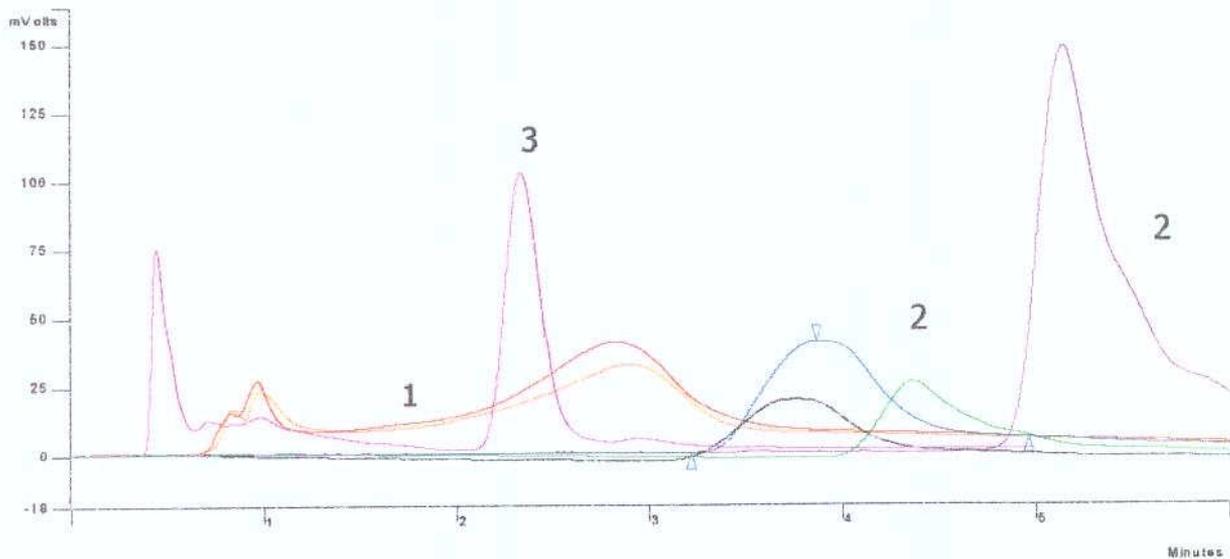


Figura 2 – Cromatogramas sobrepostos referentes às variações realizadas (fluxo, tempo de corrida, métodos de extração e fase móvel).

### **Condições de cromatografia**

O sistema de CLAE foi constituído por uma bomba ternária Varian 9010, um detector Varian UV-VIS 9050 acoplado ao software integrador Millennium 5.0. As amostras foram injetadas manualmente através de injetor tipo reodine, com coluna LiChrospher 100 RP-18 (endcapped, 150 x 4.6 mm x 5 µm). Para a análise das amostras de saliva armazenadas foram adotados os parâmetros cromatográficos que apresentaram melhores resultados. Dentre as fases móveis testadas, a que apresentou melhores resultados foi com tampão fosfato 0,01M (pH=4,7) com 7% de acetonitrila (isocrática), a qual foi degaseificada em banho ultrassônico previamente ao uso. Além disso, o tempo de retenção do metronidazol foi de aproximadamente 2.0 minutos com fluxo de 1.5 ml/min e o volume de injeção foi de 50µL, com o

detector a 320 nm. Todas as corridas cromatográficas tiveram tempo padronizado em 5 minutos.

### ***Efeito da temperatura e do tempo de armazenagem sobre a concentração***

Após a definição das melhores condições cromatográficas, as amostras foram estocadas nas seguintes condições:

- 1 – Em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 7 dias;
- 2 - Em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 7 dias;
- 3 - Em refrigerador a  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  durante 7 dias;

Os resultados foram comparados em termos de precisão e linearidade e a melhor temperatura seria adotada para a próxima fase (análise das amostras após armazenagem). Diante da homogeneidade dos resultados após 7 dias entre as formas de armazenagem propostas, as amostras de saliva para a análise foram armazenadas nas três condições visando avaliar possíveis variações na dosagem do metronidazol após um período mais longo (1, 3 e 6 meses).

### ***Parâmetros de eficácia de dosagem por CLAE***

#### ***Curva de calibração***

A curva de calibração foi calculada a partir da saliva (blank) acrescida das concentrações de Metronidazol, demonstrando linearidade dentro do intervalo proposto (entre o maior e o menor nível mensurável) de forma a obter resultados proporcionais à concentração do fármaco. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente de forma a determinar a precisão, exatidão e a linearidade do método empregado. O limite de quantificação (LQ) do fármaco também foi determinado ( $0,015 \mu\text{g/mL}$ ). Foram considerados na avaliação da curva de

calibração, o desvio, menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o limite de quantificação (LQ) e menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração. As figuras 3 e 4 mostram, respectivamente, os cromatogramas obtidos após a elaboração do método mais apropriado para a dosagem do metronidazol em saliva e a equação da reta da curva de calibração.

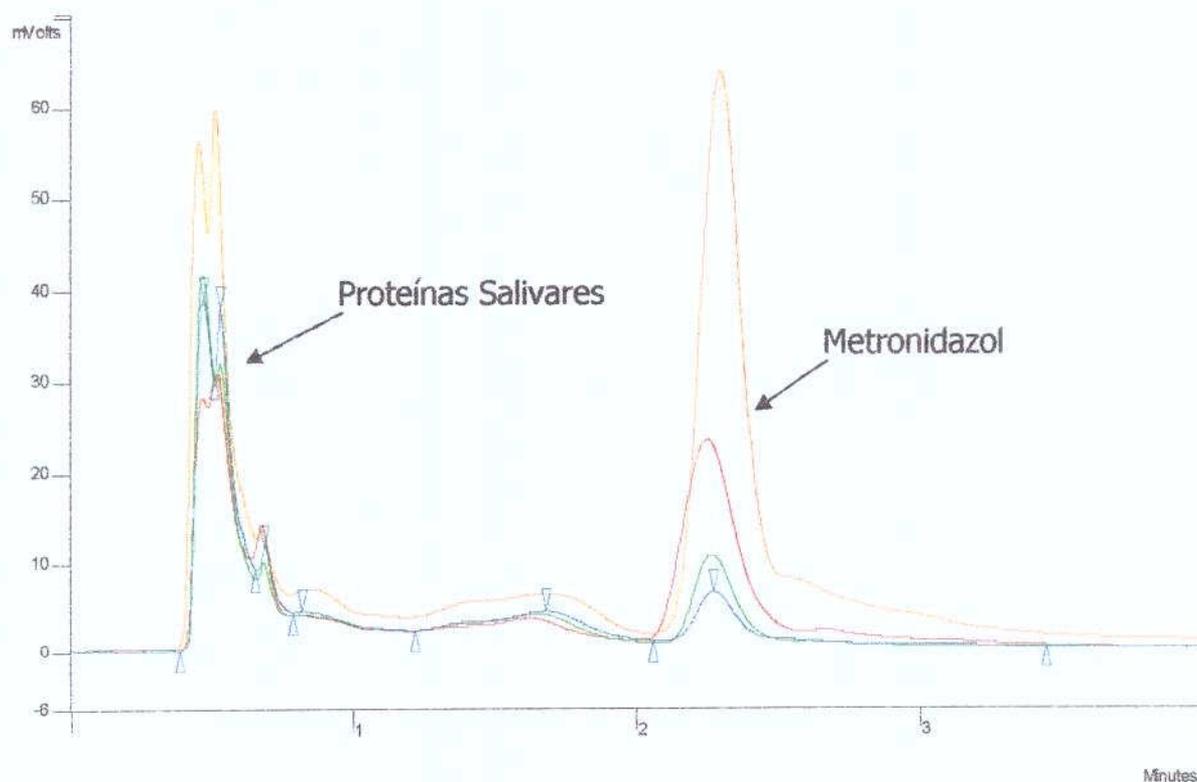


Figura 3 – Cromatogramas sobrepostos para a elaboração da curva de calibração.

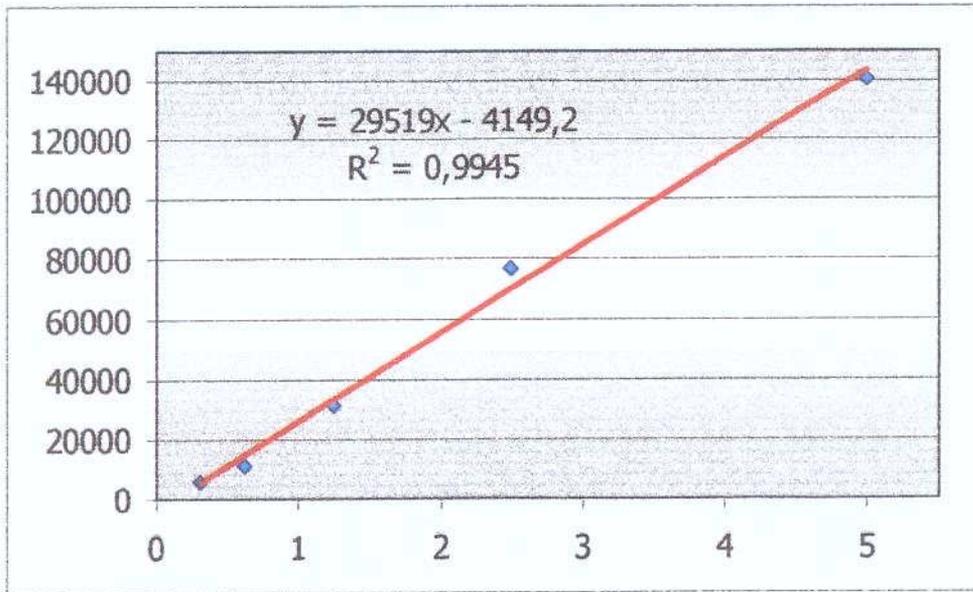


Figura 4 - Equação da reta da curva de calibração.

## RESULTADOS

Após a elaboração do método cromatográfico para a dosagem do metronidazol em saliva, as amostras armazenadas foram analisadas, em triplicatas. A tabela 2 mostra as médias das áreas dos picos cromatográficos obtidas referentes.

Concentração de Metronidazol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Refrigerador $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 30 dias	Freezer - $70^{\circ}\text{C}$ 30 dias	Freezer - $20^{\circ}\text{C}$ 30 dias
5			
2,5	111008	<u>140854</u>	117103
1,25	40477	<u>91230</u>	70229
0,625	25185	<u>40690</u>	40458
0,312	12733	<u>17472</u>	18928
0,156	5235	<u>10765</u>	8158
0,078	3209	<u>5785</u>	4856
0,039	1510	<u>2292</u>	1962
0,0195	1167	<u>1192</u>	1010
	512	<u>542</u>	520

Tabela 2 – Áreas dos picos cromatográficos após o período de 30 dias.

Todas as condições de armazenagem avaliadas após 30 dias apresentaram linearidade em relação ao método cromatográfico e quando comparadas à curva de calibração. As amostras que apresentaram melhores resultados após o período de 30 dias foram aquelas armazenadas a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , uma vez que demonstraram as maiores áreas nos picos cromatográficos referentes ao metronidazol. A análise estatística para a verificação da eficácia dos métodos de armazenagem testados será realizada após o término das análises das amostras após os períodos de 3 e 6 meses. A seguir estão as equações de reta para cada condição de armazenagem (demonstrando linearidade em relação ao método cromatográfico empregado) e os cromatogramas obtidos após as análises das amostras armazenadas nas diferentes condições após o período de 30 dias.

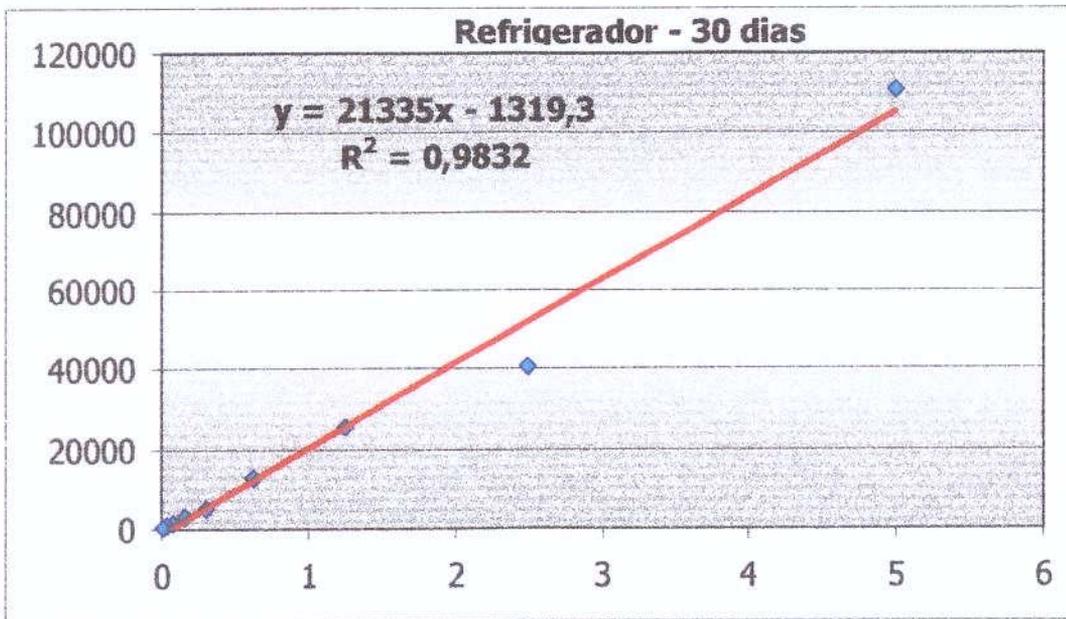


Figura 5 – Equação de reta obtida com os resultados referentes à armazenagem em refrigerador por 30 dias.

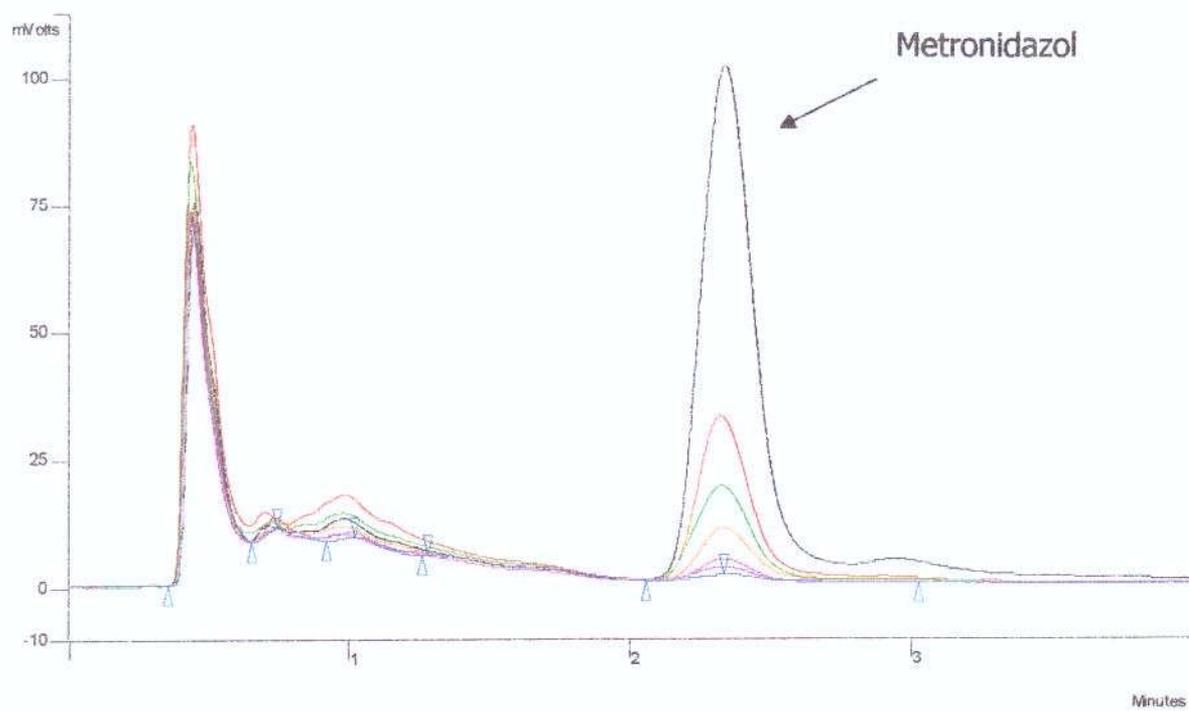


Figura 6 – Cromatogramas sobrepostos referentes às diferentes concentrações de metronidazol armazenadas em refrigerador por 30 dias.

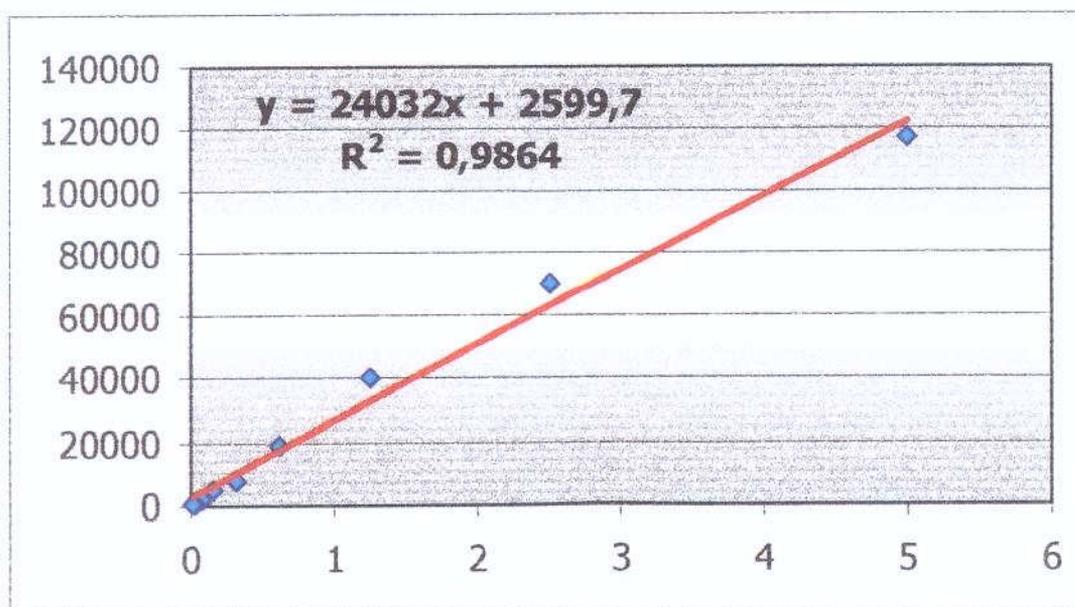


Figura 7 – Equação de reta obtida com os resultados referentes à armazenagem em freezer comum (-20°C) por 30 dias.

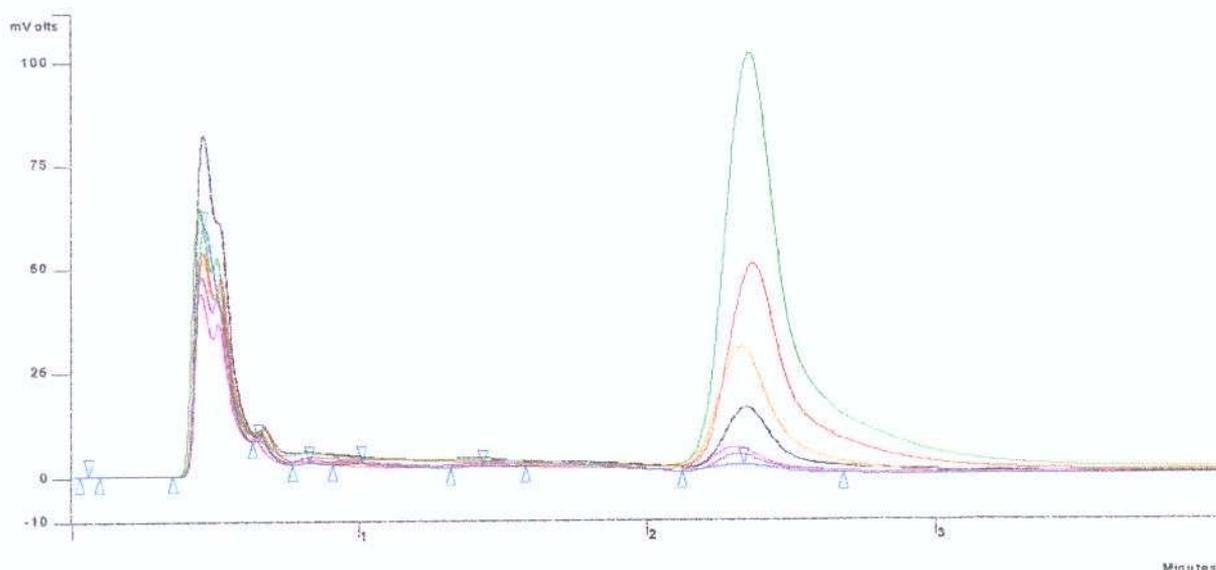


Figura 8 – Cromatogramas sobrepostos referentes às diferentes concentrações de metronidazol armazenadas em freezer comum (-20°C) por 30 dias.

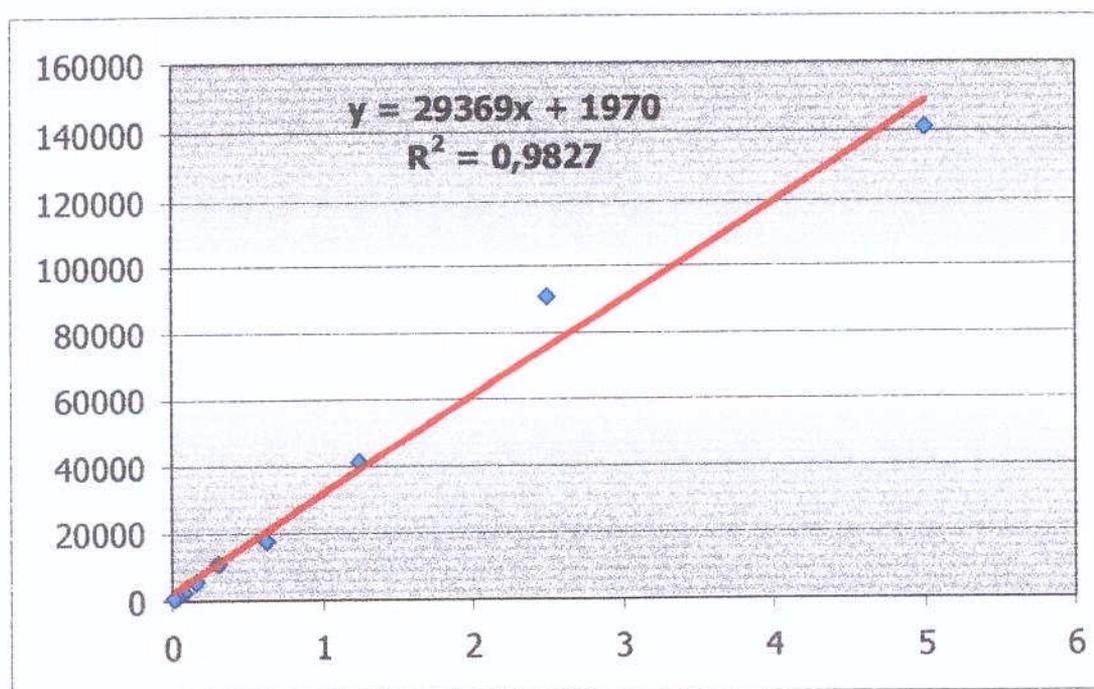


Figura 9 – Equação de reta obtida com os resultados referentes à armazenagem em freezer (-70°C) por 30 dias.

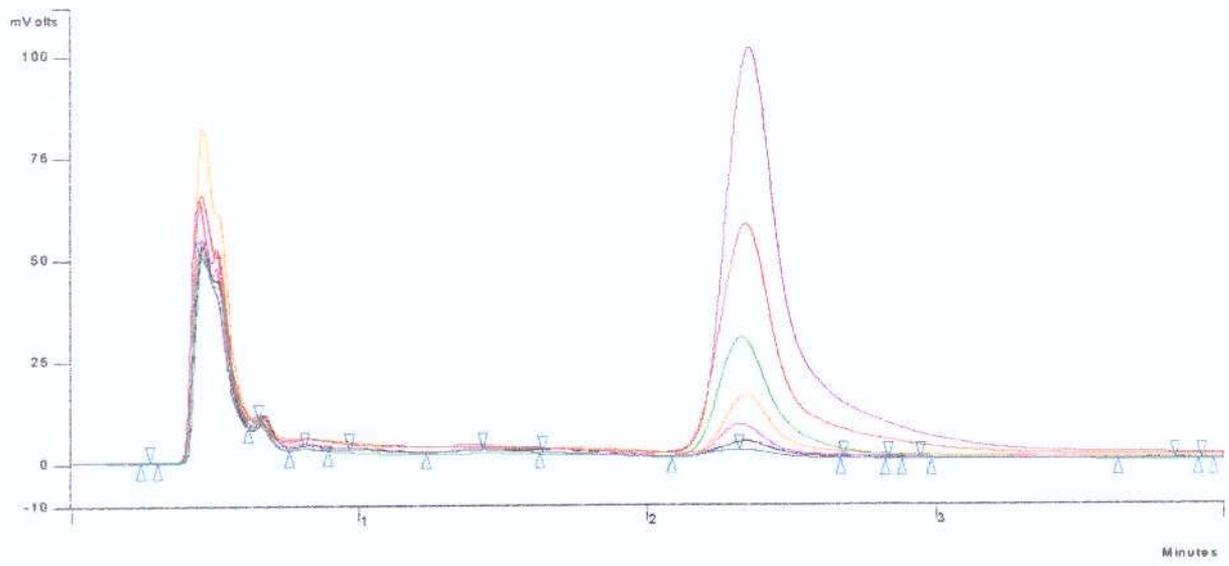


Figura 10 – Cromatogramas sobrepostos referentes às diferentes concentrações de metronidazol armazenadas em freeze (-70°C) por 30 dias.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Como já descrito anteriormente, devido à necessidade da aprovação do Projeto junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP- FOP/UNICAMP) para o início das análises das amostras dos voluntários, ocorreu uma alteração em relação ao cronograma inicial de atividades.

Embora o aperfeiçoamento do método cromatográfico (com a saliva do aluno pesquisador) tenha sido elaborado no prazo proposto do cronograma inicial, as análises do metronidazol na saliva dos voluntários iniciaram-se após a aprovação do Projeto, em maio de 2004 (Anexo 1).

Portanto, até o presente momento foram realizadas as dosagens do metronidazol em saliva para o período de 1 mês. As amostras referentes aos períodos faltantes (3 e 6 meses), já se encontram armazenadas e serão analisadas após a expiração dos prazos propostos. Após o término das dosagens referentes aos períodos faltantes, os resultados serão submetidos à Análise Estatística. Um novo relatório final será elaborado e enviado ao PIBIC/CNPq, e o trabalho será submetido à publicação. O trabalho foi apresentado com os resultados no XII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp em outubro de 2004.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Bodur, A. ; Bodur, H. ; Bal, B. ; Balos, K. Generalized aggressive periodontitis in a prepubertal patient: a case report. *Quintessence Int*; 32(4):303-8, 2001.
- 2 - Buchmann, K.; Nunn, M.E.; Van Oyke, T.E., Langa, D.E. Aggressive periodontitis 5-year follow-up of treatment. *J. Periodontology*, 73(6): 675-83, 2002.
- 3 - Feres, M.; Haffajee, A.D.; Allard, K.; Som, S.; Socransky, S.S. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol.*; 28(7):597-609, 2001
- 4 – Hutchings, A.D.; Monie, R.D.; Spragg, B.P.; Routledge, P.A. Saliva and plasma concentrations of isoniazid and acetylisoniazid in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 25:585-589, 1998
- 5 - Khemaleelakul, S.; Baumgartner, J.C.; Pruksaldorn, S. Identification of bacteria in acute endodontic infection and their antimicrobial susceptibility. *Oral surg. Oral Med Pathol Oral Radiol Endod*, 94(6): 746-55, 2002
- 6 - Lau, A.H.; Lam, N.P.; Piscitelli, S.C.; Wilkes, L. & Danziger, L.H. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. *Clin. Pharmacokinet* 23:328-364, 1992
- 7 - Lindhe, J.; Liljenberg, B.; Adielson, B.; And Börjesson, I. Use of Metronidazole as a Probe in the Study of Human Periodontal Disease, *J Clin Periodontal* 10:110-112, 1983
- 8 - Loesche, W. J.; Syed, S. A.; Morrison, E.C.; Laughton, B.; And Grossman, N.S. Treatment of Periodontal Infections Due to Anaerobic Bacteria with Short-term Treatment with Metronidazole, *J Clin Periodontal* 8:29-44, 1981

- 9 - Loesche, W. J.; Syed, S. A.; Morrison, E.C., Kerry, G. A.; Higgins, T.; And Stoll, J. Metronidazole in Periodontitis. I. Clinical and Bacteriological Results after 15-30 weeks, *J Periodontol* 55:325-335, 1984
- 10 - Martin S.B., Wan S.H., Karam J.H.(1974): Pharmacokinetics of tolbutamide, prediction by concentration in saliva. *Clin Pharmacol Ther* 15:1052-1058, 1974
- 11 - Newman, H.N.; Yeung, F.I.S.; Wan Yusof, W. Z. A. B. Slow Release of Metronidazole and Simplified Mechanical Oral Hygiene Regimen in The Control of Chronic Periodontitis, *J Clin Periodontal* 11:576-582, 1984
- 12 - Roe, F.J. Metronidazole: review of uses and toxicity. *J Antimicrob Chemother.* 3:205-212, 1977
- 13 - Rooney, J.; Wade, W.G.; Sprague, S.V.; Newcomb, R.G.; Addy, M. Adjunctive effects to non surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amixycillin alone and combined. A placebo controlled study. *J Clin Periodontol* 29 (4):342-50, 2002
- 14 - Shinn, D.L.S. Metronidazole in Acute Ulcerative Gingivitis, *Lancet* 1:1191, 1962
- 15 - Suryawati, S.; Santoso, B. Determination of isoniazid half-life from salivary samples. *Int J Pharmacol Ther Toxicol* 24:18-22, 1986
- 16 - Tracy, J. W. & Webster, L. T. Protozoal Infections: Amebiasis, Giardiasis, Trichomoniasis. New York: McGraw-Hill, 2001.
- 17 - Versell, E.S.; Passananti, G.T.; Glenwright, P.A .; DVORCHIK, B. H. Studies on the disposition of antipyrine and phenacetin using plasma, saliva and urine. *Clin Pharmacol Ther* 18:259-272, 1975
- 18 - Watson, I. D.; Stewart, M. J. Trimethoprim: prediction of serum concentrations from saliva measurements. *Eur J Clin Pharmacol* 30:547-461, 1986