

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**MODELAGEM FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÂMICA
DA PIPERACILINA EM RATOS IMUNODEPRIMIDOS
INFECTADOS COM *Escherichia coli***

BIBIANA VERLINDO DE ARAUJO

PORTO ALEGRE, 2002.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MODELAGEM FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÂMICA DA
PIPERACILINA EM RATOS IMUNODEPRIMIDOS
INFECTADOS COM *Escherichia Coli*

Dissertação apresentada por **Bibiana
Verlindo de Araujo** para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Dalla Costa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 6 de maio de 2002, perante a comissão examinadora constituída por:

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Afonso Barth
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Guilherme Suarez Kurtz
Instituto Nacional do Câncer – Rio de Janeiro

A663mAraújo, Bibiana Verlindo de

Modelagem farmacocinética-farmacodinâmica da piperacilina em ratos imunodeprimidos e infectados com *escherichia coli* / Bibiana Verlindo de Araújo – Porto Alegre: UFRGS, 2002. – 88 p.: il., tab., graf.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Modelagem farmacocinética-farmacodinâmica. 2. Infecção experimental. 3. *Escherichia coli*. 4. Piperacilina. 5. Antibióticos beta-lactâmicos. 6. Microdiálise. I. Dalla Costa, Teresa Cristina Tavares. II. Título

CDU:615.2.015.4

Bibliotecárias Responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro F.Ferreira, CRB 10/480
Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com bolsa de estudos financiada pela CAPES.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Teresa Dalla Costa, pela oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional, pelo exemplo e sobretudo pela amizade;

À Profa. Dra. Elfrides Schapoval pela confiança depositada ao disponibilizar seu laboratório para grande parte dos meus experimentos;

Aos professores doutores Sílvia Guterres, Adriana Polhman, Vera Eifler Lima, Stela Rates, Amélia Henriques, Pedro Ros Petrovick, George Ortega, Ana Bergold, Grace Grossmann, José Angelo Zuanazzi, Célia Chaves, Martin Steppe, Valquíria Bassani, Pedro Fröhelich e Eloir Schenkel por toda sua contribuição durante minha formação neste programa;

Aos funcionários do Laboratório de Controle de Qualidade, em especial a Lorena, Leila e Vivian, por sua atenção e colaboração;

À Cândida Buffé, Eduardo Palma, Gabriela da Rosa e Juliana Bertuol pela grande amizade e por suas valiosas contribuições durante o decorrer deste trabalho;

A todos os amigos que encontrei neste programa, agradeço pelos momentos de aprendizado e convivência que certamente deixarão saudades.

A minha querida avó Anita, e aos meus tios Jorge e Eliana que sempre me incentivaram a acreditar nos sonhos;

A minha família, em especial a minha mãe e meus irmãos, pelo carinho, apoio e torcida.

Ao Francisco por todo seu amor, apoio, compreensão e dedicação durante esta caminhada.

SUMÁRIO

Agradecimentos	vii
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xv
Resumo	xvii
Abstract	xviii
1. Introdução	3
2. Objetivos	9
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3. Revisão Bibliográfica	13
3.1 Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica	13
3.2 Modelos de Infecção Experimental	16
3.3 Microdiálise	20
3.4 Piperacilina	24
4. Metodologia	31
4.1 Materiais e Equipamentos	31
4.2 Métodos	33
4.2.1 Imunodepressão	33
4.2.2 Preparo do Inoculo	33
4.2.3 Avaliação do Crescimento Bacteriano <i>In Vivo</i>	33
4.2.4 Avaliação do Processo Infeccioso	34

4.2.5	Preparo das Soluções de Piperacilina	34
4.2.6	Experimentos de Farmacodinâmica – Infecção Experimental	35
4.2.7	Metodologia Analítica para Avaliação da Piperacilina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	36
4.2.8	Processamento das Amostras de Microdialisado e de Plasma	36
4.2.9	Validação da Metodologia Analítica para CLAE	37
4.2.10	Experimentos de Farmacocinética	38
4.2.10.1	Procedimentos Cirúrgicos	38
4.2.10.2	Microdiálise	38
4.2.10.3	Calibração <i>In Vitro</i> das Sondas	39
4.2.10.4	Calibração <i>In Vivo</i> das Sondas	39
4.2.10.5	Ligação as Proteínas Plasmáticas	40
4.2.11	Avaliação dos Resultados e Estimativa dos Parâmetros Farmacocinéticos	40
4.2.11.1	Análise Não-Compartimental	40
4.2.11.2	Análise Compartimental	41
4.2.11.3	Análise Estatística	43
4.2.12	Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica	43
5.	Resultados	47
5.1	Método Cromatográfico	47
5.1.1	Linearidade	48
5.1.2	Repetibilidade e Precisão Intermediária	50
5.1.3	Exatidão	51
5.1.4	Limite de Quantificação	52
5.2	Avaliação da Imunodepressão nos Animais	52
5.3	Avaliação do Crescimento Bacteriano <i>In Vivo</i>	53
5.4	Avaliação do Processo Infecioso	54
5.5	Determinação da Ligação as Proteínas Plasmáticas	56

5.6 Calibração das Sondas de Microdiálise	57
5.7 Avaliação Farmacocinética da Piperacilina	58
5.7.1 Avaliação Farmacocinética Não-Compartimental	58
5.7.2 Avaliação Farmacocinética Compartimental	61
5.7.3 Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica	66
6. Conclusões	81
7. Referências Bibliográficas	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da piperacilina.

Figura 2. Cromatogramas da piperacilina em plasma.

Figura 3. Cromatogramas da piperacilina em microdialisado de tecido.

Figura 4. Curva média utilizada na validação da metodologia para doseamento de piperacilina em plasma.

Figura 5. Curva de crescimento bacteriano *in vivo* da *Escherichia coli* ATCC 25922.

Figura 6. Microfotografia de músculo estriado.

Figura 7. Perfil de concentração plasmática em função do tempo após administração *i.v. bolus* de piperacilina 240 mg/kg .

Figura 8. Ajuste simultâneo das concentrações plasmáticas totais e livres teciduais médias de piperacilina após administração *i.v. bolus* de 240 mg/kg.

Figura 9. Simulação do perfil de concentração livre tecidual da piperacilina, previsto através dos parâmetros plasmáticos para a dose de 120 mg/kg (painel superior). Perfil de morte bacteriana por tempo após administração de PIP 120 mg/kg de 4/4 h modelado utilizando-se a equação de E-max modificado.

Figura 10. Simulação do perfil de concentração livre tecidual da piperacilina, previsto através dos parâmetros plasmáticos para a dose de 120 mg/kg (painel superior). Perfil de morte bacteriana por tempo após administração de PIP 120 mg/kg de 6/6 h modelado utilizando-se a equação de E-max modificado.

Figura 11. Simulação do perfil de concentração livre tecidual da piperacilina, previsto através dos parâmetros plasmáticos para a dose de 120 mg/kg (painel

superior). Perfil de morte bacteriana por tempo após administração de PIP 120 mg/kg de 8/8 h modelado utilizando-se a equação de E-max modificado.

Figura 12. Simulação do perfil de concentração livre tecidual da piperacilina, previsto através dos parâmetros plasmáticos para a dose de 240 mg/kg (painel superior). Perfil de morte bacteriana por tempo após administração de PIP 240 mg/kg de 4/4 h modelado utilizando-se a equação de E-max modificado.

Figura 13. Simulação do perfil de concentração livre tecidual da piperacilina, previsto através dos parâmetros plasmáticos para a dose de 240 mg/kg (painel superior). Perfil de morte bacteriana por tempo após administração de PIP 240 mg/kg de 6/6 h modelado utilizando-se a equação de E-max modificado.

Figura 14. Simulação do perfil de concentração livre tecidual da piperacilina, previsto através dos parâmetros plasmáticos para a dose de 240 mg/kg (painel superior). Perfil de morte bacteriana por tempo após administração de PIP 240 mg/kg de 8/8 h modelado utilizando-se a equação de E-max modificado.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Comparação entre os parâmetros farmacocinéticos da piperacilina obtidos em ratos saudáveis e imunodeprimidos.
- Tabela 2. Tempo de eutanásia dos animais para retirada dos músculos para contagem bacteriana.
- Tabela 3. Coeficientes de correlação das curvas de calibração de piperacilina em plasma usadas na validação da metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Tabela 4. Coeficientes de variação intradia e interdia das médias das amostras da curva de calibração de piperacilina em plasma obtidas por CLAE.
- Tabela 5. Coeficientes de variação intradia e interdia das médias das três amostras controle utilizadas para a curva de calibração de piperacilina em plasma.
- Tabela 6. Exatidão das três amostras de controle de qualidade utilizadas para a curva de calibração de PIP em plasma de ratos e as concentrações médias calculadas com seus respectivos desvios padrões.
- Tabela 7. Parâmetros farmacocinéticos não-compartimentais obtidos para o perfil de concentração plasmática total após administração *i.v. bolus* de piperacilina 240 mg/kg.
- Tabela 8. Parâmetros farmacocinéticos não-compartimentais obtidos para o perfil de concentração tecidual livre após administração *i.v. bolus* de piperacilina 240 mg/kg.
- Tabela 9. Análise estatística pelo teste “t” de Student dos parâmetros não-compartimentais teciduais e plasmáticos da dose de 240 mg/kg.

Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos compartimentais obtidos para o perfil de concentração plasmática total após administração *i.v. bolus* de piperacilina 240 mg/kg.

Tabela 11. Parâmetros farmacocinéticos compartimentais utilizados na modelagem farmacocinética-farmacodinâmica.

Tabela 12. Parâmetros resultantes da modelagem farmacocinética-farmacodinâmica da piperacilina nas doses de 120 e 240 mg/kg.

RESUMO

Objetivos: Avaliar a adequabilidade do modelo farmacocinético-farmacodinâmico (PK-PD) (NOLTING *et al.*, 1996b) para modelar o efeito bactericida da piperacilina (PIP) em ratos Wistar infectados experimentalmente com *Escherichia coli* ATCC 25922. **Metodologia:** *Experimentos de Farmacocinética:* Determinou-se as concentrações plasmáticas totais e livres teciduais de PIP, através de microdiálise (MD), após administração de 240 mg/kg i.v. *bolus* a ratos Wistar granulocitopênicos (ciclofosfamida) infectados no músculo esquelético (10^5 UFC/mL) com *E. coli*. As amostras de plasma e de MD foram analisadas por CLAE. As sondas de MD foram calibradas por retrodiálise. *Experimentos de Farmacodinâmica:* Os animais imunodeprimidos e infectados foram tratados com PIP nas doses de 120 ou 240 mg/kg, em intervalos de 4/4, 6/6 e 8/8 horas por 24 h. Em tempos pré-determinados, os animais foram sacrificados ($n = 3/\text{tempo}$), o músculo infectado foi retirado, homogeneizado e o número de UFC/mL foi determinado em placas de ágar-sangue, após diluições sucessivas. Um grupo não tratado foi utilizado como controle. *Modelagem PK-PD:* A partir dos dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos obtidos, avaliou-se efeito de morte bacteriana em função do tempo com o auxílio do programa de regressão não-linear SCIENTIST[®] v.2.0. **Resultados e Discussão:** Os parâmetros farmacocinéticos após a administração de PIP (240 mg/kg) foram $t_{1/2}$ de 40 ± 8 min; CL de $0,46 \pm 0,021$ (L/h/kg) e um V_{dss} de $0,30 \pm 0,06$ L/kg. O perfil de PIP livre tecidual foi previsto a partir dos parâmetros plasmáticos utilizando ajuste simultâneo dos dados de plasma e tecido e um fator de proporcionalidade de $0,342 \pm 0,101$. Os parâmetros do modelo PK-PD obtidos foram: EC_{50} de $1,31 \pm 0,27$ $\mu\text{g/mL}$ e k_{max} $1,39 \pm 0,20$ h^{-1} . Os valores dos parâmetros da modelagem PK-PD obtidos *in vivo* diferiram dos descritos na literatura para o mesmo antibiótico e bactéria quando simulados *in vitro*. **Conclusões:** O modelo E_{max} -modificado descreveu os perfis de crescimento e morte bacteriana em função do tempo obtidos nas diferentes posologias testadas sendo adequado para modelagem PK-PD da piperacilina nas condições experimentais investigadas.

Palavras-chave: modelagem PK-PD, antibiótico b-lactâmico, piperacilina, farmacocinética, microdiálise

ABSTRACT

Purpose: The objective of this study was to model the killing effect of a β -lactam antibiotic, piperacillin (PIP), in neutropenic and *E. coli* ATCC 25922 infected rats after different dosing regimens using a modified E_{max} PK-PD model. **Methodology:** *Pharmacokinetic studies:* Total plasma and free tissue concentrations of PIP, determined by microdialysis, were investigated after i.v. bolus of 240 mg/kg of the drug to immunocompromised (cyclophosphamide) and *E. coli* infected (10^7 CFU) Wistar rats. Microdialysis probes recoveries were determined by retrodialysis. Plasma and tissue samples were analyzed by HPLC. *Pharmacodynamic studies:* The infected rats were treated with iv bolus PIP 120 mg/kg or 240 mg/kg q8h, q6h, q4h. Three animals were sacrificed at predetermined times up to 24 hours. The infected muscle was removed, homogenized and the number of CFU/mL was determined by plate counting after 24 hours of incubation at 37°C. A control group without treatment was used. *PK-PD modeling:* PIP killing effect as a function of time was fitted using the E_{max} -modified model with the aid of a non-linear regression computer program SCIENTIST[®] v.2.0. **Results and Discussion:** The pharmacokinetic parameters determined for PIP 240 mg/kg iv bolus were: $t_{1/2}$ of 40 ± 8 min; CL of 0.46 ± 0.021 (L/h/kg) and V_{dss} of 0.30 ± 0.06 L/kg. Piperacillin free tissue levels were predicted using plasma data in a simultaneous fitting with a proportionality factor of 0.342 ± 0.101 . The parameters derived from PK-PD modeling were: bacterial killing rate (k_{max}) of 1.39 ± 0.20 h⁻¹ concentration to produce 50% of de maximum effect (EC_{50}) of 1.31 ± 0.27 μ g/mL. The PK-PD parameters determined *in vivo* were different from those reported for the same bacteria and drug *in vitro*. **Conclusions:** The E_{max} model adequately described PIP antibacterial effect in animals for the different dosing regimens investigated.

Key-words: PK-PD modeling, β -lactam antibiotic, piperacillin, pharmacokinetics, microdialysis

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Há alguns anos surgiram na literatura os modelos farmacocinéticos-farmacodinâmicos (PK/PD) que são aplicados na simulação e previsão de efeito, bem como na otimização de posologias de diversos fármacos (LECHAT *et al.*, 1997). Esses modelos estabelecem uma correlação matemática entre os elementos da tríade concentração efetiva do fármaco, efeito farmacológico e tempo.

Para que o modelo seja desenvolvido, realizam-se estudos do perfil farmacocinético do fármaco (PK), administrando-se diferentes posologias e monitorando-se as concentrações plasmáticas obtidas e, muitas vezes, as concentrações livres no plasma ou no local de ação. Paralelamente, procede-se a avaliação farmacodinâmica em função do tempo (PD), após a administração de diferentes posologias, para determinar o efeito obtido devido à variação de concentração do fármaco em estudo. De posse dos dados de PK e PD, busca-se a correlação matemática entre as mesmas, de modo que o modelo desenvolvido possa servir para otimizar a utilização terapêutica do fármaco.

No caso específico dos antibióticos, o parâmetro farmacodinâmico atualmente utilizado para determinação da posologia é a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (MATTIE, 1981). Este parâmetro considera apenas a susceptibilidade do microrganismo a uma concentração constante do fármaco, apesar de haver comprovação na literatura que em concentrações abaixo da CIM os microrganismos ainda apresentem crescimento (MATTIE, 1981). Desse modo, uma avaliação mais concreta da relação concentração do fármaco *versus* atividade microbiana faz-se necessária. Esta avaliação pode ser realizada através da modelagem PK/PD.

Uma vantagem do desenvolvimento de modelos PK/PD para antibióticos é o fato de que o efeito em questão é a morte do microrganismo. Dessa forma, a avaliação da eficácia poder ser realizada através da contagem de células viáveis no local da infecção após a exposição deste ao antimicrobiano em estudo. Através dos modelos de infecção experimental desenvolvidos *in vivo*, fatores importantes como o mecanismo de defesa anti-infeccioso e a metabolização do fármaco podem ser considerados, dando assim uma idéia mais realista a respeito da ação do antimicrobiano sobre o microrganismo.

Um modelo PK-PD para antibióticos β -lactâmicos foi desenvolvido por NOLTING e colaboradores em 1996(a) baseando-se na equação farmacodinâmica

sigmoidal de E_{max} . Este modelo foi avaliado a partir da simulação *in vitro* de diferentes perfis de concentração livre tecidual de piperacilina (PIP) esperados no tecido infectado de seres humanos após administração de doses tradicionais deste fármaco. A infecção experimental produzida *in vitro* foi tratada com o fármaco e o efeito de morte bacteriana foi determinado. Da modelagem dos dados experimentais realizados com o modelo E_{max} modificado, três novos parâmetros foram determinados para a avaliação do efeito antimicrobiano: a velocidade de geração bacteriana (k), o efeito máximo, através da velocidade de morte bacteriana máxima (k_{max}) e a concentração de antibiótico necessária para produzir 50 % do efeito máximo (EC_{50}). Estes parâmetros descrevem, de modo mais abrangente que a CIM, a relação entre o antibiótico e o microrganismo e podem ser usados para simulações de posologias da piperacilina não avaliadas experimentalmente (NOLTING *et al.*, 1996a).

O modelo de infecção experimental *in vitro* e o modelo PK-PD desenvolvido foram utilizados com sucesso para avaliar a associação de piperacilina com tazobactama (inibidor de β -lactamase) (DALLA COSTA *et al.*, 1998). O modelo PK-PD desenvolvido, no entanto, possui limitações que impedem sua aplicação direta na prática clínica. As mais importantes estão relacionados com: a) o modelo de infecção experimental *in vitro* utilizado para avaliar o efeito do antibiótico sobre os microrganismos, pois sabe-se que o comportamento bacteriano *in vitro* difere daquele observado *in vivo*, no processo infeccioso (SIMTH, 1996); b) a determinação das concentrações livres do fármaco simuladas na infecção experimental *in vitro*, pois as mesmas foram obtidas em tecidos sadios de animais, ao invés de tecidos infectados.

Sabe-se que uma infecção causa alterações fisiológicas no tecido onde ocorre e que estas podem alterar a distribuição de fármacos (MATTIE, 1981). Desse modo, o conhecimento das concentrações livres de antimicrobianos no tecido durante a infecção é fundamental, pois estas são as concentrações ativas contra o microrganismo infectante. Visando obter um modelo de infecção experimental que facilitasse tanto a avaliação farmacocinética como a farmacodinâmica, no mesmo animal experimental, ARAUJO e colaboradores (1999) adaptaram para ratos Wistar o modelo de miosite desenvolvido para camundongos por Vogelmann e colaboradores em 1988.

Utilizando o modelo de miosite em ratos, DINIZ e colaboradores (2002) avaliaram as concentrações livres teciduais de PIP no músculo infectado de animais imunodeprimidos utilizando a técnica de microdiálise. Duas doses de PIP (60 e 120 mg/kg) foram investigadas 2 h após a inoculação dos animais (infecção recente) e 24 h após o início da infecção (infecção tardia). Não foram observadas diferenças significativas entre os perfis livres teciduais de PIP nos dois momentos de investigação (2 e 24 horas após o início da infecção) e constatou-se que estas concentrações podem ser previstas a partir de parâmetros farmacocinéticos determinados com os dados plasmáticos.

A segunda limitação dos experimentos de infecção experimental realizados *in vitro*, e utilizados por NOLTING e colaboradores 1996(a) para desenvolver o modelo PK-PD, é que as bactérias comportam-se de maneiras distintas *in vitro* e *in vivo* (ZAK e O'REILLY,1991). Desse modo, o modelo PK-PD desenvolvido pode não descrever de modo adequado a variação do efeito antimicrobiano no processo infeccioso *in vivo* ou, no mínimo, os valores dos parâmetros k , k_{max} e EC_{50} precisam ser reavaliados.

Neste contexto, este projeto pretendeu dar continuidade à linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida neste Programa de Pós-Graduação, através da investigação farmacocinética da piperacilina em dose não avaliada anteriormente, bem como, da avaliação farmacodinâmica da PIP em diferentes posologias, utilizando o modelo de miosite em ratos. De posse dos dados de PK e PD pretendeu-se testar a adequabilidade *in vivo* do modelo E_{max} modificado proposto para o fármaco.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a adequabilidade do modelo PK-PD desenvolvido *in vitro* para piperacilina (NOLTING *et al.*, 1996a) utilizando os dados de PK e PD obtidos em ratos Wistar infectados experimentalmente com *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as concentrações teciduais livres de piperacilina (antibiótico β -lactâmico) em tecido muscular de ratos imunodeprimidos e infectados experimentalmente com *Escherichia coli* ATCC 25922 no processo de infecção inicial (3 h) após administração de dose única i.v. 240 mg/kg, utilizando a técnica de microdiálise;
- Determinar a taxa de ligação a proteínas plasmáticas da piperacilina em ratos imunodeprimidos através de microdiálise;
- Avaliar o efeito farmacodinâmico da piperacilina em animais imunodeprimidos e infectados com *Escherichia coli* ATCC 25922 nas doses de 120 e 240 mg/kg administrada *i.v. bolus* na veia caudal de 4/4, 6/6 e 8/8 horas, através da contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de homogeneizado de músculo em função do tempo, utilizando o modelo de infecção do músculo tibial cranial adaptado por Araujo e colaboradores em 1999;
- Determinar a correlação entre o efeito farmacodinâmico da PIP e as concentrações livres intercelulares no tecido infectado, através de modelo PK-PD previamente desenvolvido, com o auxílio do programa de regressão não-linear Scientist[®] v.2.0., verificando sua adequabilidade para descrever os dados experimentais obtidos.
- Comparar os parâmetros do modelo PK-PD obtidos *in vivo* com os descritos para PIP na literatura, obtidos de experimentos *in vitro*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MODELAGEM FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÂMICA

A farmacocinética estuda a variação da concentração do fármaco no organismo em função do tempo. A farmacodinâmica, por sua vez, pode ser definida como o estudo dos efeitos bioquímicos e fisiológicos dos fármacos e dos seus mecanismos de ação (HARDMAN *et al.*, 1996), sendo que modelos farmacodinâmicos descrevem o equilíbrio entre a concentração do fármaco e o efeito, independente do tempo. Desse modo, a concentração, que é o ponto de intersecção entre esses dois ramos da farmacologia, é o parâmetro mais importante na relação efeito-tempo, existente na modelagem farmacocinética-farmacodinâmica (PK/PD). Essa modelagem pode ser definida como a descrição matemática desta relação, que permite prever a variação do efeito com a variação da concentração do fármaco no organismo, em função do tempo (HOLFORD e SHEINER, 1981;DERENDORF e HOCHHAUS, 1995).

Modelos farmacodinâmicos, quando aplicados para antimicrobianos, têm como vantagem o fato de que a célula alvo é a própria bactéria. Com isso, podemos monitorar a atividade do fármaco de forma mais detalhada, apenas estudando o seu efeito no crescimento e/ ou morte bacteriana.

Os modelos farmacodinâmicos mais utilizados para descrever a relação concentração versus efeito do fármaco são os modelos E_{max} e E_{max} -Sigmoidal (DERENDORF e MEIBOHM, 1999). Estes modelos possuem duas propriedades importantes: determinar o efeito nulo na ausência do fármaco e prever o efeito máximo que um fármaco pode produzir.

O modelo E_{max} descreve o efeito do fármaco em relação à variação da concentração através de uma relação hiperbólica. O modelo de E_{max} -Sigmoidal, que é uma variação do primeiro, é utilizado quando a curva concentração-efeito não pode ser descrita de forma hiperbólica simples. O modelo sigmoidal é descrito pela seguinte equação (DERENDORF e HOCHHAUS, 1995):

$$E = \frac{E_{max} \cdot C^n}{EC_{50}^n + C^n} \quad (1)$$

onde E é o efeito do fármaco; E_{max} é o efeito máximo obtido pelo fármaco; C é a concentração do fármaco; EC_{50} é a concentração do fármaco que produz 50 % do efeito máximo; n é o fator de Hill, que influencia a curvatura da curva efeito-concentração.

O expoente n é um fator que, teoricamente, reflete o número de moléculas do fármaco que se ligam a um receptor específico. Se n for um, o modelo E_{max} será hiperbólico; se for diferente de um, será sigmoidal (DERENDORF e HOCHHAUS, 1995).

O modelo de E_{max} foi modificado por Nolting e colaboradores em 1996, para avaliar o efeito bactericida da piperacilina sobre *Escherichia coli in vitro*. O desenvolvimento desse modelo foi realizado a partir de simulações, utilizando modelo de infecção experimental *in vitro*, do perfil de concentração tecidual livre esperado em tecido muscular de humanos após administração *i.v. bolus* de piperacilina.

Na ausência do fármaco, o crescimento bacteriano pode ser expresso pela variação do número de colônias em função do tempo (dN/dt), que é função direta da constante de geração bacteriana (k) e do número de unidades formadoras de colônias no tempo zero (N) ou inóculo:

$$\frac{dN}{dt} = k \cdot N \quad (2)$$

Entretanto, quando o antibiótico é inserido no sistema, sua concentração passa a influenciar negativamente a constante de geração bacteriana, e o efeito do antibiótico pode ser determinado através da equação (NOLTING *et al.*, 1996a):

$$\frac{dN}{dt} = \left(k - \frac{k_{max} \cdot C}{EC_{50} + C} \right) \cdot N \quad (3)$$

onde dN/dt é a variação do número de bactérias em função do tempo; k é a constante de geração bacteriana na ausência do antibiótico; k_{max} é a constante de morte bacteriana máxima na presença do antibiótico; C é a concentração livre do antibiótico no tecido infectado; EC_{50} é a concentração que produz 50 % do efeito

máximo e N é o número de bactérias no inóculo inicial. Nesta equação, C é substituído pela equação que descreve o perfil de concentração livre intercelular do fármaco no tecido infectado. Deste modo, a variação de tempo leva à variação tanto na concentração de fármaco na biofase quanto no número de bactérias ou colônias presentes no local de infecção, que determinam o efeito.

Ao contrário da utilização da CIM, que é um parâmetro estanque, obtido com uma concentração fixa do fármaco, este modelo estabeleceu três novos parâmetros para a avaliação do efeito antimicrobiano sobre o microrganismo: k , k_{\max} e EC_{50} . Estes parâmetros servem para descrever, todo o perfil de efeito observado devido a flutuação do fármaco no local de infecção, em função da eliminação. Outra vantagem do modelo é permitir a previsão, através de simulação, do efeito esperado após a administração de diferentes posologias do fármaco podendo ser utilizado para comparação de diferentes doses e intervalos de dose de modo mais dinâmico e efetivo.

O modelo PK-PD para piperacilina descrito pela equação 3 foi desenvolvido simulando-se os perfis de concentração livre tecidual esperados em humanos contra *E. coli in vitro*. A simulação do tempo de meia-vida da piperacilina na infecção experimental *in vitro* foi feita através da diluição do meio de cultura onde se encontrava a bactéria sem, no entanto, alterar o número de bactérias presentes. Deste modo, os parâmetros que descrevem o modelo PK-PD (k , k_{\max} e EC_{50}) podem assumir valores diferentes quando a infecção ocorre *in vivo*.

Neste trabalho será utilizado o modelo de miosite em ratos para obter tantos os dados de concentração livre tecidual, através de microdiálise, quanto os dados de morte bacteriana. Serão avaliadas diferentes posologias do fármaco e a aplicabilidade *in vivo* do modelo PK-PD será investigada.

Este modelo PK-PD já foi testado em outros trabalhos. DALLA COSTA e colaboradores (1998), avaliaram a associação de piperacilina com tazobactama, um inibidor de β -lactamase, através de um modelo de infecção experimental *in vitro*, com a avaliação farmacocinética conduzida em animais sadios. O resultado demonstrou que o modelo PK-PD foi capaz de modelar os dados, mesmo com a associação da PIP ao inibidor de β -lactamase.

DELACHER e colaboradores (2000) obtiveram sucesso na modelagem de seus dados utilizando como antibiótico modelo o ciprofloxacino, uma fluorquinolona. Neste trabalho, o perfil de concentração livre tecidual simulado *in vitro* contra

Pseudomonas aeruginosa foi obtido através de microdiálise muscular em humanos. Os resultados obtidos da modelagem indicaram que o modelo pode ser utilizado para outras classes de antibióticos.

3.2 MODELOS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Diversos modelos de infecção experimental em animais são descritos na literatura e têm sua importância reconhecida pelo papel fundamental que exercem nos estudos de eficácia e avaliação de antibioticoterapias.

Esses modelos acompanham a pesquisa e o desenvolvimento de antimicrobianos desde as primeiras descobertas e foram, muitas vezes, essenciais para que se pudesse chegar a alguns dos fármacos antimicrobianos que, ainda hoje, encontram aplicação na terapia anti-infecciosa, como é o caso das sulfonamidas e penicilinas (DUDLEY e GRIFFITH, 2002).

Os testes *in vitro* são apenas a primeira etapa na avaliação da atividade farmacológica de um agente antimicrobiano pois a maioria das ações neles observadas não se reproduzem quando transpostos para modelos *in vivo* (ZAK e O'REILLY, 1991).

Essa diferença na atividade deve-se, principalmente, ao fato de que os estudos *in vitro* permitem avaliar apenas a susceptibilidade inerente do microrganismo ao antimicrobiano em questão (CLEELAND e GRUNBERG, 1986), deixando de considerar fatores que podem alterar a eficácia do fármaco, principalmente os processos metabólicos e os mecanismos de defesa anti-infecciosa do hospedeiro (ZAK e O'REILLY, 1991).

Os modelos de doenças infecciosas em animais, utilizados nos estudos do potencial antimicrobiano desses agentes, permitem que se estabeleça uma relação entre os estudos *in vitro* e um provável resultado clínico, sendo uma etapa intermediária entre esses dois processos.

Apesar de que a avaliação final da eficácia clínica de um fármaco deve basear-se nas experiências clínicas, os modelos animais podem servir de base para prever determinadas respostas farmacológicas.

Existem diferentes modelos de estudos de antimicrobianos usando animais. Entre eles pode-se citar os modelos para avaliação da toxicidade, para avaliação da eficácia e os que envolvem estudos farmacocinéticos (ZAK e O'REILLY, 1991).

Embora existam diferenças no perfil farmacocinético, metabolismo do fármaco e anatomia entre animais e humanos, os modelos para avaliação da toxicidade de antimicrobianos podem dar indícios sobre possíveis efeitos tóxicos de um fármaco após um período de exposição curto ou longo, dose máxima tolerável, entre outros fatores, sendo um pré-requisito para o início das experiências clínicas (ZAK e O'REILLY,1991).

Para a avaliação da eficácia de agentes antimicrobianos, ao contrário do que existe para os modelos de toxicidade, não há protocolos detalhados, o que constitui a grande dificuldade para quem deseja executar esse tipo de análise.

Os modelos para a avaliação da eficácia podem ser classificados em quatro grupos: modelos básicos de investigação de antimicrobianos, modelos *ex vivo*, modelos monoparamétricos e modelos discriminativos (ZAK e O'REILLY,1991).

Os primeiros são os mais comumente utilizados e prestam-se à rotina de avaliação de antimicrobianos, com técnicas simples como a indução de imunodepressão nos animais, inoculação dos microrganismos, retirada das estruturas e contagem das células viáveis após regimes de tratamento simples, como doses múltiplas do fármaco (ZAK e O'REILLY,1991).

Os modelos básicos são reprodutíveis, de curta duração, e servem especialmente para diminuir interferências ambientais, com parâmetros simples como o de "tudo ou nada" (ZAK e O'REILLY,1991), ou seja, existência ou não de células viáveis nas estruturas infectadas após o tratamento.

Nessa categoria estão incluídos os modelos de infecção na coxa de camundongos, as septicemias intra-abdominais causadas pela flora intestinal, as meningites e pneumonias, todos utilizando a mesma espécie animal (ZAK, 1980). Basicamente são usados nas avaliações primárias de antibióticos, principalmente pela facilidade de execução e baixo custo.

Esses modelos, entretanto, não se prestam para avaliações mais exatas da eficácia terapêutica, por estarem comprometidos por diversas limitações originárias das diferenças inerentes entre uma infecção experimental (simulada) e uma doença humana de ocorrência natural (NISHINO e ZAK, 1985). Dentre esses fatores podemos destacar o fato de que nesses modelos o progresso da infecção é fulminante o que, além de descaracterizá-la, pode ter uma consequência maior na medida em que o tratamento com o antibiótico, que inicia-se em um curto espaço de tempo após a inoculação do animal, pode ter uma ação mais profilática do que

terapêutica. Além disso, tais experimentos são muito sensíveis ao tamanho do inóculo, o qual pode interferir gerando resultados falso-positivos ou falso-negativos.

A procedência, o sexo, a idade e a padronização das condições de vida dos animais envolvidos é outro fator muito importante, à medida que podem torná-los mais ou menos susceptíveis às infecções (ZAK e O'REILLY,1991). Diferenças farmacocinéticas que podem ocorrer entre a administração do fármaco em dose única ou doses múltipla também devem ser consideradas, pois, podem afetar os resultados e, assim, inviabilizar uma comparação entre diferentes fármacos.

Os chamados modelos *ex-vivo* se caracterizam pela presença de corpos estranhos, geralmente implantes subcutâneos previamente infectados por bactérias. Podem ser usados coágulos de fibrina e sacos de diálise, entre outros materiais (ZAK e O'REILLY,1991).

Esses modelos se prestam para a avaliação da capacidade de penetração de determinados antibióticos em um sítio de infecção específico, sendo usados também na determinação da velocidade de morte bacteriana, nos estudos dos efeitos de agentes anti-infecciosos, na fisiologia e morfologia desses microrganismos e, ainda, na possível seleção de mutantes resistentes ocasionada por um desses agentes (ZAK e O'REILLY,1991).

Os modelos monoparamétricos são muito parecidos com os modelos básicos de investigação de antimicrobianos, diferenciando-se destes pelo aumento na complexidade do experimento e ordem de execução (ZAK e O'REILLY,1991).

Enquanto os modelos básicos são aplicados em estágios primários de estudos da eficácia de antibióticos, os monoparamétricos são aplicados em estágios mais adiantados, quando são determinados, por exemplo, seus efeitos em tecidos moles e a capacidade de ação em infecções crônicas. As determinações das contagens de bactérias em tecidos e concentração de antibióticos nos mesmos são exemplos típicos desses modelos.

Por fim, tem-se os modelos discriminativos, que são os que envolvem as técnicas mais complexas, mimetizando o início e a progressão de uma infecção em humanos. Nesses modelos, múltiplos parâmetros de eficácia são avaliados para averiguar se o uso de um determinado antimicrobiano é adequado para uma doença humana em particular (ZAK e O'REILLY, 1991).

O maior problema dos modelos descritos anteriormente é a diferença que existe entre os perfis farmacocinéticos de animais e humanos, principalmente devido

à rápida velocidade de eliminação de fármacos, característica de animais de pequeno porte (BOXENBAUM, 1982). O fracionamento da dose total diária (DALHOFF e ULMANN, 1990) ou a infusão contínua (MIZEN *et al.*, 1989), objetivando obter concentrações plasmáticas do fármaco próximas à de humanos, tem sido algumas das alternativas utilizadas para superar essa rápida eliminação. Entretanto, esse é um recurso limitado, pois pressupõe o conhecimento dos perfis farmacocinéticos do fármaco em humanos e no animal experimental. Quando esses perfis não são conhecidos, a saída encontrada é a administração do fármaco na dose padronizada e a alteração da função renal dos animais, através da administração de substâncias como o nitrato de uranila, que causam dano renal e, com isso, aumenta o tempo de permanência do fármaco no animal, igualando o tempo de meia-vida ao observado em humanos (ZAK e O'REILLY, 1991).

O modelo de infecção em coxa de camundongos foi descrito pela primeira vez em 1950, quando EAGLE e colaboradores demonstraram o efeito pós-antibiótico *in vivo* utilizando penicilina contra *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae* (VOGELMAN *et al.*, 1988).

VOGELMAN e colaboradores, em 1988, aplicaram-no num estudo semelhante, utilizando animais neutropênicos. Esse modelo possui certas características peculiares que o tornam muito útil para o desenvolvimento de estudos farmacodinâmicos e sua correlação com a farmacocinética. DALHOFF e ULLMANN (1990), enumeraram algumas dessas características:

- O fato da eliminação de antimicrobianos ser muito rápida em camundongos permite que os regimes de dosagem, próprios para o fármaco em estudo, possam ser variados em maior extensão nesses animais do que em humanos, o que permite uma correlação entre os parâmetros farmacocinéticos e a eficácia do fármaco.
- A cinética e o efeito antibacteriano podem ser diretamente correlacionados através da contagem de bactérias no sítio da infecção e as concentrações do fármaco no plasma podem ser monitoradas.

- A granulocitopenia pode ser induzida nos animais, o que permite que o estudo do agente antimicrobiano não tenha interferência de neutrófilos e outros polimorfonucleares.

Com base nesses fatos, em 1999 Araujo e colaboradores adaptaram esse modelo de miosite a ratos machos Wistar imunodeprimidos. O alvo da infecção foi o músculo tibial cranial, de fácil acesso nesses animais, o que facilita sua retirada cirúrgica, após eutanásia dos animais, para posterior homogeneização, diluição e contagem do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL (ARAUJO *et al.*, 1999).

3.3 MICRODIÁLISE

As concentrações livres de fármacos no fluido intersticial são as responsáveis pela resposta farmacológica do mesmo no organismo. Visando a determinação do perfil de concentração livre intersticial de fármacos, a microdiálise (MD) *in vivo* tem encontrado importantes aplicações no campo da farmacocinética, especialmente na investigação da distribuição e metabolismo dos mesmos (DEGUCHI *et al.*, 1991).

Com a técnica de microdiálise originada na década de 60 para a avaliação de neurotransmissores, pode-se acessar a fração livre do fármaco, através do implante de uma sonda de diálise no tecido ou órgão de interesse, a qual é constantemente irrigada com um líquido de perfusão compatível, com fluxo constante e controlado (JOHANSEN *et al.*, 1997). Na porção terminal da sonda situa-se uma membrana semipermeável, que obedece aos princípios da difusão passiva, que é mantida constantemente sob condição *sink*. Esta técnica permite determinar as concentrações livres da substância em estudo uma vez que apenas a fração não ligada a proteínas presentes no líquido intersticial sofrerá o processo de difusão através da membrana.

Somente substâncias com baixo peso molecular são difundidas através da membrana por diferença de gradientes de concentração (JOHANSEN *et al.*, 1997). As substâncias difundidas são coletadas na outra extremidade da sonda, para posterior análise.

Uma das dificuldades encontradas na MD é a determinação da recuperação da membrana, pois muitos fatores interferem na diferença entre a concentração

obtida no dialisado e a concentração da substância sob investigação no meio externo. Entre estes fatores pode-se citar a taxa de perfusão, a área superficial da membrana, o peso molecular máximo difundido através da mesma, a temperatura, o tipo de soluto a ser analisado e as propriedades do meio externo (MENACHERRY *et al.*, 1992).

Para um dado conjunto de condições experimentais, a taxa entre a concentração do dialisado e a concentração do meio externo é a medida da eficiência ou recuperação da membrana.

Os testes de recuperação podem ser realizados *in vitro* e *in vivo*. A recuperação *in vitro* é estimada utilizando-se como meio externo uma solução com concentração conhecida do soluto que se deseja analisar. Através da determinação da concentração resultante no dialisado obtém-se a recuperação pela relação (RR) (BENVENISTE, 1989):

$$RR = \left(\frac{C_{dial}}{C_{ext}} \right) \times 100 \quad (4)$$

onde RR é a taxa de recuperação relativa, C_{ext} é a concentração conhecida do meio externo e C_{dial} é a concentração do soluto no dialisado.

Os testes de recuperação *in vivo* são mais complexos, uma vez que a determinação da concentração no meio externo é o objetivo final do estudo. A determinação da recuperação *in vivo*, no entanto, é imprescindível pois as diferenças nas características do meio externo observada *in vitro* e *in vivo* podem determinar diferenças nas taxas de recuperação obtidas.

Dentre as técnicas para a determinação da recuperação *in vivo* pode-se citar duas de maior aceitação: o método do fluxo líquido zero e a retrodiálise (BENVENISTE, 1989).

3.3.1 Fluxo Líquido Zero (FLZ)

LÖNNROT e colaboradores, em 1987, desenvolveram esta técnica que está baseada na determinação do transporte de massa do soluto através da membrana como função da concentração do mesmo no líquido de perfusão (perfundido).

É necessário que o fármaco a ser avaliado esteja na concentração de *steady state* no animal em estudo, o que é obtido pela administração do mesmo por infusão contínua. A sonda de MD é irrigada com solução contendo diferentes concentrações do fármaco sob investigação. Quando a concentração do fármaco é menor no perfundido que no meio externo, a difusão ocorre do meio externo para a sonda de MD. A situação é inversa quando a concentração do fármaco é maior no perfundido, direcionando a difusão da sonda para o meio externo.

O ponto onde não há transporte líquido é a condição na qual os meios interno e externo possuem igual concentração. Este ponto pode ser obtido por regressão linear da quantidade líquida transportada em função da concentração do perfundido. A quantidade líquida transportada é determinada pela subtração da concentração da substância recuperada no dialisado da concentração original da solução perfundida. A equação que descreve a relação entre fluxo líquido e concentração do perfundido tem como inclinação a recuperação relativa da sonda de MD (ELMQUIST e SAWCHUK, 1997):

$$\text{Fluxo líquido} = (RR \cdot C_{\text{ext}}) - C_{\text{perf}} \quad (5)$$

ou

$$(C_{\text{dial}} - C_{\text{perf}}) = (RR \cdot C_{\text{ext}}) - C_{\text{perf}} \quad (6)$$

onde C_{dial} é a concentração no dialisado, C_{perf} é a concentração no perfundido, RR é a taxa de recuperação relativa e C_{ext} é a concentração no meio externo (tecido).

3.3.2 Retrodiálise

Esta técnica pode ser considerada um caso especial do fluxo líquido zero, onde um análogo do fármaco de interesse (calibrador) ou o próprio fármaco é

adicionado ao perfundido. A concentração do calibrador, que deve possuir difusibilidade semelhante à do fármaco de interesse caso não seja o próprio fármaco, é zero na região externa da sonda. Por isso, o fluxo líquido é sempre negativo (ELMQUIST e SAWCHUK, 1997) e a recuperação pode ser calculada pela equação:

$$RR = \frac{C_{cal} - C_{dial}}{C_{cal}} \quad (7)$$

onde RR é a taxa de recuperação, C_{cal} é a concentração do calibrador/soluto no líquido perfundido e C_{dial} é a concentração do calibrador/soluto no líquido dialisado.

Esta técnica tem a vantagem de permitir um monitoramento contínuo da recuperação *in vivo* durante o experimento propriamente dito, quando se usa um calibrador.

A determinação da recuperação das sondas por retrodiálise está baseada no conceito de que o transporte da substância do interior da sonda para o meio externo (perda) e deste para o interior da sonda (ganho) é idêntico nos dois sentidos. Esta premissa, no entanto, não é válida para todos os tipos de fármacos, como mostraram os trabalhos de GROTH e JØRGENSEN (1997), através do estudo comparativo destas relações para fármacos hidrofílicos e lipofílicos.

Os resultados obtidos por estes autores indicaram que a medida que aumentam as características lipofílicas do fármaco, esta relação vai se deslocando cada vez mais no sentido da perda, ou seja, o transporte do fármaco para o meio externo aumenta, mas sua entrada para o interior da sonda é reduzida. O mesmo, no entanto, não ocorre com fármacos hidrofílicos, que mantêm a relação entre suas taxas de perda e ganho iguais a 1.

Para que possamos avaliar a recuperação das sondas quando estamos trabalhando com fármacos lipofílicos que apresentam esta diferença entre perda e ganho, uma alternativa é a determinação da recuperação em relação a perda e ao ganho de maneira distinta, e o cálculo de um fator de correção, pelo qual as recuperações serão corrigidas.

Para que se possa obter o valor real das concentrações teciduais livres, a normatização dos dados obtidos por MD é feita utilizando a taxa de recuperação de cada membrana usada nos experimentos.

Para análise do dialisado pode-se empregar diversos tipos de instrumentação como, por exemplo, espectrometria de massas, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), eletroforese capilar e imunoenaios. Todas essas técnicas exigem amostras purificadas, o que na microdiálise é uma vantagem, uma vez que a amostra coletada pode ser analisada diretamente, sem processamento, pois está isenta de proteínas (JOHANSEN *et al.*, 1997)

Além da pureza, a MD possibilita o monitoramento de mais de um compartimento, bem como de mais de uma substância de interesse simultaneamente no mesmo animal experimental (JOHANSEN *et al.*, 1997).

A MD apresenta algumas desvantagens, tais como o pequeno volume coletado em cada amostra e a necessidade de testes de recuperação das membranas *in vitro* e *in vivo*, como discutido anteriormente.

3.4 PIPERACILINA

Quimicamente a piperacilina (PIP) (Figura 1), que foi desenvolvida por Toyama Chemical Co. Ltda é o 2S-[2,(5,(6((S*))]-6-[[[(4-etil-2,3-dioxo-1-piperazinil)carbonil]-amino] fenilacetil]amino]-3,3-dimetil-7oxo-4-tia-1-azobicyclo-[3.2.0]heptano-2-carboxilato (FORTNER *et al.*, 1982).

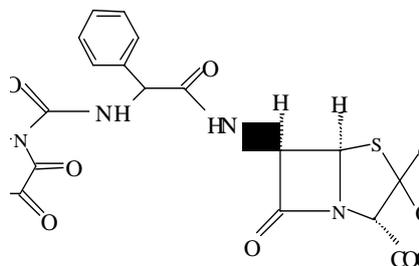


Figura 1. Estrutura química da piperacilina, penicilina semi-sintética.

Esse antibiótico pertence à família das ureidopenicilinas, que constituem um grupo de antibióticos semi-sintéticos originados da ampicilina pela ligação à cadeia lateral de radicais acila-derivados de uma molécula de uréia. Desse modo o nome mais adequado para este seria acilureidopenicilinas (TAVARES, 1996).

A piperacilina é um derivado piperazínico da ampicilina e, como os demais de seu grupo, apresenta um amplo espectro de ação, principalmente contra

microorganismos Gram-negativos aeróbicos, como *Enterobacter*, e muitas *Klesbisiella* (HARDMAN *et al.*,1996), potente atividade anti-pseudomonas e menor toxicidade que os antibióticos aminoglicosídeos, sendo β -lactamase sensível (TAVARES, 1996).

O mecanismo de ação da PIP está relacionado com seu efeito sobre a parede celular bacteriana (HOLMES *et al.*,1984). Liga-se covalentemente às proteínas de ligação das penicilinas (PBP), localizadas entre as camadas do envólucro celular.

A piperacilina tem alto grau de afinidade com a PBP 3, que é importante para a divisão celular, com a PBP 1a e PBP 1b, responsáveis pela integridade da parede celular e PBP 2, responsável pela forma da parede celular (NOLTING *et al.*, 1996a).

Em baixas concentrações de piperacilina, as bactérias produzem filamentação sem atividade lítica. A lise celular ocorre em altas concentrações, sem filamentação apreciável (DEVER e DERMODY, 1991).

A PIP foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) para tratamento de pacientes com infecções sérias causadas por microrganismos específicos e suscetíveis ao fármaco (*Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sp.*, entre outros) em infecções intra-abdominais de trato urinário, ginecológicas, septicemia, infecções do trato respiratório baixo, infecções de pele e de suas estruturas. Nos Estados Unidos é comercializada pelos Laboratórios Lederle com o nome comercial de Pipracil (FORTNER *et al.*, 1982). No Brasil a piperacilina é comercializada em associação com a tazobactama, um inibidor de β -lactamase, com o nome comercial de Tazocin[®], pelo laboratório Wyeth, divisão da Lederle (DEF, 2001).

A piperacilina é um antibiótico β -lactâmico de administração intramuscular (i.m.) ou intravenosa (i.v.), pois não é absorvida pelo trato gastrointestinal (REYNOLDS, 1993).

De acordo com FORTNER e colaboradores (1982) e HOLMES e colaboradores (1984) a taxa de ligação a proteínas plasmáticas em humanos oscila entre 20 e 30%.

Após injeção *i.v. bolus* de PIP em humanos o volume aparente de distribuição calculado é de 12-20 L. O *clearance* total, que varia de 2,68 a 3,7 mL/min/kg, diminui levemente com a dose. O fármaco é excretado de forma intacta pelo mecanismo renal (80%) e biliar após administração *i.v. bolus* e *i.m.* Quando a administração é

feita por infusão, a excreção total é menor que a produzida por *i.v. bolus*. O tempo de meia vida em humanos é de 1 h (FORTNER *et al.*, 1982).

A piperacilina apresenta farmacocinética não-linear, especialmente quando administrada em altas doses, conforme os experimentos realizados por HOLMES (1984) e MORRISON e BATRA (1979), desse modo os perfis de concentração para diferentes doses deve ser avaliado experimentalmente.

Em ratos, a farmacocinética da PIP já foi bem estudada e os dados encontrados na literatura estão descritos na Tabela 1.

Na Tabela 1 pode-se observar a grande variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos determinados pela análise não-compartimental dos dados plasmáticos ($t_{1/2}$, V_{dss} e CL) determinados em animais sadios (Nolting *et al.*, 1996b). Deste modo pode-se concluir que o tempo de meia-vida, o volume de distribuição no *steady-state* e o *clearance* total não foram alterados devido aos processos de imunodepressão e infecção, ou seja, o perfil plasmático da piperacilina não foi alterado em relação aos animais sadios.

A comparação entre os parâmetros obtidos após a análise compartimental (α e β) mostrou que estes se encontram na mesma ordem de magnitude nos três grupos, corroborando a conclusões obtidas na análise não-compartimental.

Tabela 1. Comparação entre os parâmetros farmacocinéticos da PIP obtidos em ratos sadios e infectados e imunodeprimidos.

Parâmetros Farmacocinéticos	Ratos Sadios 120 mg/kg ¹	Ratos Infectados 2 h e Imunodeprimidos 120 mg/kg ²	Ratos Infectados 24 h e Imunodeprimidos 120mg/kg ²
$t_{1/2}$ (min)	36 ± 8	26 ± 13	49 ± 21
V_{dss} (L/kg)	0,52 ± 0,41	0,16 ± 0,06	0,34 ± 0,12
CL (mL/min/kg)	15,3 ± 9,4	5,58 ± 1,7	4,98 ± 3,5
ASC _{PLASMA 0-∞} (µg*min/mL)	9921 ± 4138	23091 ± 6668	21558 ± 8243
α (min ⁻¹)	0,36 ± 0,22	0,19 ± 0,04	0,28 ± 0,16
β (min ⁻¹)	0,030 ± 0,008	0,030 ± 0,01	0,020 ± 0,01

1. Nolting *et al.*, 1996b.

2. Diniz *et al.*, 2002.

A ligação a proteínas plasmáticas mostrou valores semelhantes para ratos saudáveis ($0,54 \pm 0,11$) e para ratos imunocomprometidos e infectados ($0,53 \pm 0,11$) (DINIZ *et al.*, 2002).

Conforme relatado na literatura, a piperacilina apresenta desvio da linearidade para doses elevadas (MORRISON e BATRA, 1979), deste modo, a avaliação do perfil farmacocinético em doses superiores a 120 mg/kg se faz necessária para permitir uma adequada modelagem PK-PD.

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Ciclofosfamida (Sigma, St. Louis, USA).
- Carbamato de etila (Urethane[®] Sigma, St. Louis, USA).
- Piperacilina sódica (Sigma, St. Louis, USA).
- Heparina sódica 5.000 UI/ml (Liquemine[®], Roche)
- Fosfato monobásico de potássio p.a. (Merck[®])
- Hidróxido de Sódio p.a. (Reagen[®])
- Acetonitrila grau CLAE (Ominisolv[®])
- Meio antibiótico número 1 (Difco[®]).
- Ágar sangue

Ágar soja tripticaseína (Difco [®])	40g
Água destilada	1000 mL
Sangue de carneiro	50 mL

- Solução de Ringer

Cloreto de sódio (Reagen [®])	8,702 g
Cloreto de cálcio (Reagen [®])	225 mg
Cloreto de potássio (Reagen [®])	298 mg
Água destilada	q.s.p. 1 L

- Líquido de Turk

Azul de metileno (Hoesch [®])	4 gotas
Ácido acético glacial (Synth [®])	4 mL
Água destilada	q.s.p. 100 mL

- Corante Pantocrômico (May-Gruenwald e Giemsa)

Corante de Giemsa (Reagen [®])	125 mL
--	--------

Corante de May-Gruenwald (Reagen [®])	215 mL
Álcool metílico (Synth [®])	600 mL

- Ratos machos Wistar pesando entre 250-300g
- Sondas para microdiálise Harvard Apparatus (tipo *loop*, membrana com permeabilidade máxima de 6000 daltons, diâmetro: 450 µm, comprimento: 4 mm).
- Conectores para sondas de microdiálise de sílica fundida (Harvard Apparatus com 50 cm de comprimento)
- Adaptador de sílica fundida (Harvard Apparatus com 75 µm diâmetro interno x 150 µm de diâmetro externo)
- Coluna Waters fase reversa Novapak C18 15 cm 4 x 150 mm.
- Pré-coluna µBondapak[®] C18 37-50 µm- Waters
- Suporte de pré-coluna Waters 50 x 200 mm
- Membranas de filtração Millipore[®] 0,45 mm de poro, 13 mm de diâmetro, hidrofílica.
- Equipamento para Microdiálise (Bomba MD-1020 Bee Hive Controller - BAS, Módulo para seringa MD-1001 Baby Bee Syringe Drive - BAS).
- Cromatógrafo Líquido de alta eficiência com injetor manual Rheodyne (bomba Waters 510; detector de ultravioleta modelo 481; controlador de gradiente Waters; software Millennium 32[®]).
- Potenciômetro Micronal B 374.
- Centrífuga 5417 R Eppendorf.
- Espectrofotômetro Analyser 800
- Agitador de tubos Mod. 251 Fanem.
- Homogeneizador de tecido PowerGen 125
- Programa de Regressão não-linear SCIENTIST v.2.0. (MicroMath, Salt Lake City, USA)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Imunodepressão

A indução da imunodepressão nos ratos machos Wistar, com peso entre 250 e 300 g, foi realizada através da administração intraperitoneal de ciclofosfamida nas doses de 150 mg/kg e 100 mg/kg, 4 e 1 dias antes do ensaio, respectivamente (VOGELMAN *et al.*, 1988). Os animais foram mantidos com água e alimentação *ad libitum*, em caixas contendo no máximo cinco.

Para avaliação da imunodepressão, três animais tratados e três animais controles, que receberam salina em volume equivalente às doses de ciclofosfamida, tiveram amostras de sangue retiradas da carótida. Nas amostras foram realizadas as contagens totais e diferenciais de leucócitos pelo método de Shilling-Torgau (LIMA *et al.*, 1992).

A comparação dos resultados hematológicos obtidos dos dois diferentes grupos foi realizada através de teste “t” de Student não-pareado ($\alpha = 0,05$).

4.2.2 Preparo do Inóculo

O inóculo para os experimentos foi preparado a partir de colônias de *Escherichia coli* ATCC 25922 (CIM 2-4 $\mu\text{g/mL}$) incubadas por 24 horas em tubos de ensaio contendo meio nº 1. Inicialmente, foi preparado um inóculo de 10^8 UFC/mL, através da suspensão das colônias em água destilada estéril, correspondente a uma leitura de turbidimetria em espectrofotômetro, a 570 nm, igual a 75%. Esse inóculo foi diluído 100 vezes em água destilada estéril (100 μl em 10 mL), para se obter uma concentração final igual a 10^6 UFC/mL, do qual foi injetado no músculo tibial cranial dos ratos, um volume igual a 100 μL .

4.2.3 Avaliação do Crescimento Bacteriano *In Vivo*

Para avaliação do crescimento bacteriano *in vivo*, 18 animais foram infectados com o inóculo preparado conforme descrito em 4.2.2 e sacrificados nos tempos 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas. A seguir, o músculo tibial cranial foi removido cirurgicamente e colocado em 10 mL de solução salina estéril, onde foi homogeneizado com o homogeneizador de tecidos. Uma alíquota de 100 μL do homogeneizado foi retirada

e diluída três vezes, utilizando-se fator de diluição igual a 10 em cada diluição. Uma alíquota de 100 µL da última diluição foi plaqueada em ágar-sangue e incubada a 37°C por 24 horas. O procedimento de diluição foi realizado em duplicata.

A contagem do número de células viáveis em função do tempo foi ajustada à equação 2, para o cálculo do parâmetro k, constante de geração bacteriana *in vivo*, através do programa de regressão não-linear SCIENTIST® v. 2.0. O tempo de meia-vida de crescimento bacteriano foi determinado a partir do valor de k obtido.

4.2.4 Avaliação do Processo Infeccioso

Com o objetivo de avaliar a extensão do processo infeccioso foi realizada análise histopatológica dos pulmões, dos rins, do fígado, do sangue e do músculo tibial cranial dos animais. Dois momentos da infecção foram avaliados, 3 e 24 horas após inoculação.

Os tecidos foram removidos cirurgicamente após a eutanásia dos animais, fixados em suporte de cortiça e conservados em solução de formaldeído a 10 % (v/v) até seu preparo histológico.

A seguir foram encaminhados para o Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde foram cortados no micrótomo, e corados com hematoxilina/eosina, para análise microscópica ¹. A análise visou identificar sinais indicativos do processo infeccioso e a presença do agente etiológico, principalmente no tecido muscular e sangüíneo, indicativo de septicemia.

4.2.5 Preparo da Solução de Piperacilina

Todas as soluções de piperacilina foram preparadas a partir da dissolução do sal sódico em solução salina estéril (NaCl 0,9%), no momento do uso, conforme recomendação descrita na literatura (REYNOLDS, 1993).

1. Análise realizada pela Dra. Maria Isabel Edelweiss, a quem agradecemos.

4.2.6 Experimentos de Farmacodinâmica - Infecção Experimental

O modelo de infecção utilizado para a avaliação farmacodinâmica foi o modelo de miosite adaptado para ratos por Araujo e colaboradores (1999), no qual o músculo tibial cranial da perna esquerda do animal é o sítio de infecção.

Para o desenho experimental foram utilizados 6 grupos, cada com três animais por tempo de coleta. Foram testadas doses múltiplas de PIP *i.v.* de 120 e 240 mg/kg, nas posologias de 4/4 horas, 6/6 horas e 8/8 horas considerando-se a prática clínica para PIP (GENNARO, 1995).

Os animais foram anestesiados com éter e inoculados conforme descrito em 4.2.2. Após três horas de inoculação, tempo necessário para a adaptação do microrganismo ao novo sítio infeccioso, iniciou-se a administração das doses de PIP, através da veia peniana, nos intervalos de dose pré-estabelecidos.

Após a administração da primeira dose, três animais foram sacrificados em cada tempo pré-determinado e procedeu-se a retirada cirúrgica do músculo infectado. Os tempos de retirada dos músculos estão mostrados na Tabela 2 para as diferentes posologias. Os músculos retirados foram homogeneizados em solução salina estéril, diluídos três vezes com fator de diluição igual a dez e plaqueados em ágar sangue, para acompanhamento do crescimento bacteriano. Após a incubação por 24 h a 37 °C o número de UFC /mL foi determinado para construção das curvas de crescimento e/ou morte bacteriana em função do tempo.

A curva de crescimento bacteriano foi obtida com os resultados dos grupos controle, específicos para cada dia de experimento. Os animais controle receberam ciclofosfamida *i.p.* nas mesmas dosagens que os tratados e foram igualmente infectados, não recebendo, no entanto, o tratamento com PIP.

Os tempos de coleta foram específicos para cada dose administrada, visando traçar o perfil do crescimento e da morte bacteriana no momento da administração de cada reforço de dose e no meio do intervalo de dose.

O fator de diluição dos homogeneizados dos grupos controles a partir de 6 horas foi modificado para viabilizar a contagem das colônias. Foram retiradas

alíquotas de 10 μ L do homogeneizado para a primeira diluição e a partir desta procederam-se diluições com fator igual a 100.

Tabela 2. Tempos de eutanásia dos animais para retirada dos músculos para contagem bacteriana.

Grupos	Intervalos de Dose		
	8/8 h	6/6 h	4/4 h
Tempos de eutanásia dos animais tratados (h)	2, 4, 8, 12, 16, 20, 24	3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24	2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18, 20, 22, 24
Tempos de eutanásia dos animais controles (h)	0, 2, 4, 8, 12	0, 2, 4, 8, 12	0, 2, 4, 8, 12

4.2.7 Metodologia analítica para Avaliação da Piperacilina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O sistema cromatográfico utilizado para as análises de plasma e microdialisado foi adaptado do trabalho de DALLA COSTA (1998).

A fase móvel para as análises de microdialisado foi preparada com tampão fosfato de potássio 0,05 M e acetonitrila 80:20 (v/v), com pH 7,4; fluxo de 1,5 mL/min e comprimento de onda para leitura do detector UV de 220 nm.

Para as análises de plasma foi necessária uma modificação nas proporções de tampão fosfato de potássio 0,05M e acetonitrila, sendo utilizada 83:17 (v/v) com pH 7,4; fluxo de 1,5 mL/min e comprimento de onda para leitura do detector UV de 254 nm.

Estas adaptações foram realizadas com o objetivo de minimizar interferentes encontrados nas amostras de plasma, que dificultavam a visualização do pico de PIP a 220 nm.

4.2.8 Processamento das Amostras de Microdialisado e de Plasma

As amostras de microdiálise coletadas tubos *Eppendorf* foram analisadas por CLAE, diretamente após a coleta, sem tratamento prévio, sendo o volume injetado no sistema cromatográfico de 20 μ L.

As amostras de plasma foram analisadas por CLAE após submetidas a um processo de precipitação de proteínas. À 200 µL de plasma foram adicionados 200 µL de acetonitrila gelada, homogenizado em vórtex e centrifugado a 11000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado, filtrado em membrana de 0,45 mm de poro, e 200 µL foram injetados no sistema cromatográfico. O branco de plasma foi preparado do mesmo modo, sem a adição de piperacilina.

As amostras de plasma coletadas em 5, 10, 15, 30 minutos foram diluídas para que tivessem concentrações dentro da faixa de linearidade das curvas de calibração. Às amostras coletas em 5 e 10 minutos, foi adicionado 600 µL de acetonitrila, fator de diluição igual a 3 e às amostras coletadas em 15 e 30 minutos, foi adicionado 400 µL de acetonitrila, fator de diluição igual a 2.

Para as curvas de calibração, adicionou-se à 200 µL de plasma solução aquosa de piperacilina para obter-se concentrações finais na faixa de 27,5 a 500 µg/mL. O volume das alíquotas adicionadas ficou na faixa de 7,5 a 10 µL. Estas amostras foram submetidas ao mesmo processo de precipitação descrito anteriormente. Todas as soluções de piperacilina utilizadas nas curvas de calibração foram preparadas no dia da análise.

Para as amostras de dialisado de tecido, as curvas de calibração foram preparadas em solução de Ringer dentro da faixa de concentração de 0,5 a 200 µg/mL, e 20 µL de cada concentração foi injetada no sistema cromatográfico. Uma injeção de 20 µL de Ringer foi utilizado como branco.

4.2.9 Validação da Metodologia Analítica para CLAE

A metodologia analítica de CLAE para análise das amostras de plasma foi validada através da avaliação da repetibilidade, linearidade, precisão, exatidão e limite de quantificação obtidos através de curvas de calibração e controles de qualidade. As curvas de calibração e controles de qualidade foram preparadas conforme descrito em 4.2.8. As amostras de controle de qualidade foram preparadas a partir de solução mãe de PIP diferente da utilizada para preparar a curva de calibração, resultando em concentração final no plasma de 75, 150 e 400 µg/mL.

Para a avaliação dos parâmetros da validação do método analítico, foram analisadas três curvas de calibração a cada dia, durante três dias consecutivos.

Determinou-se o coeficiente de correlação e os coeficientes de variação intra e interdia das curvas. A validação da metodologia foi realizada de acordo com as normas do *Guidance for Bioanalytical Methods Validation for Human Studies of the Food and Drug Administration (FDA) (Guidance FDA, 2001)*.

4.2.10 Experimentos de Farmacocinética

4.2.10.1 Procedimentos Cirúrgicos

No dia do experimento os animais imunodeprimidos conforme descrito em 4.2.1 foram anestesiados com carbamato de etila (1,25 g/kg) via i.p. Depois de anestesiados, os animais foram colocados na posição supina e o músculo tibial cranial esquerdo inoculado com 10^5 UFC de *Escherichia coli* ATCC 25922. A artéria carótida foi canulada para coleta de sangue utilizando-se cânula de poliestireno conectada à seringa de 1 mL contendo solução de heparina em salina (25 UI/mL). Decorrida uma hora da inoculação procedeu-se a inserção da sonda de microdiálise, com auxílio de agulha, no músculo infectado. A sonda foi constantemente irrigada com solução de Ringer num fluxo de 1,5 μ L/min. Procedeu-se a calibração *in vivo* da sonda conforme descrito em 4.2.10.4.

Três horas após a inoculação, isto é, duas horas após a colocação da sonda no local da infecção, administrou-se ao animal piperacilina via intravenosa na veia femural da pata posterior direita, numa dose *i.v. bolus* igual a 240 mg/kg e iniciou-se a coleta das amostras de sangue em tubos *Eppendorf* heparinizados nos tempos: zero (imediatamente antes da administração do fármaco), 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min. Sete animais foram avaliados neste grupo.

Após coleta das amostras de sangue estas foram submetidas à centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. O plasma foi separado, acondicionado em outro tubo *Eppendorf* e congelado a -20 °C até o momento de sua análise por CLAE, que ocorreu num prazo máximo de 5 dias após a coleta.

Terminado o experimento os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

4.2.10.2 Microdiálise

A microdiálise foi utilizada para determinar a concentração tecidual livre do fármaco em estudo. A sonda de microdiálise foi introduzida no músculo conforme citado nos procedimentos cirúrgicos, item 4.2.10.1.

As amostras foram coletadas no tempo zero (imediatamente antes da administração do fármaco) e a cada 20 min após essa administração do fármaco, por 120 min, utilizando-se um fluxo de 1,5 $\mu\text{L}/\text{min}$. As amostras foram analisadas através de CLAE, diretamente após a coleta.

A sonda utilizada no experimento foi previamente calibrada *in vitro*.

4.2.10.3 Calibração *In Vitro* da Sonda de MD

Para a calibração *in vitro* das sondas, estas foram colocada em tubo de ensaio contendo piperacilina em solução de Ringer na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com temperatura controlada a 37 °C. A sonda foi conectada a uma seringa alimentadora de 1 mL contendo solução de Ringer, através de um tubo conector de sílica fundida. Após estabilização desse sistema por uma hora, coletou-se três amostras com intervalos de coleta de 20 minutos.

As amostras, bem como uma alíquota da solução de piperacilina, foram analisadas por CLAE, e o cálculo da recuperação *in vitro* foi realizado com base na equação 4, conforme descrito em 3.3.

A calibração *in vitro* foi realizada previamente a cada experimento *in vivo* visando determinar a integridade das sondas.

4.2.10.4 Calibração *In Vivo* da Sonda de MD

A calibração *in vivo* das sondas foi realizada pela técnica de retrodiálise , antes dos experimentos farmacocinéticos. Animais imunocomprometidos e infectados por 1 hora tiveram a sonda implantada no músculo tibial cranial esquerdo. Foi perfundida solução de Ringer por uma hora, para que se estabelecesse o equilíbrio da sonda no tecido. Após esse período a solução de Ringer foi substituída por uma solução de piperacilina em Ringer na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que foi perfundida com mesmo fluxo. Três amostras de dialisado foram coletas em intervalos de 20 minutos. As amostras da solução de perfusão foram também

analisadas. O cálculo da taxa de recuperação *in vivo* foi realizado através da equação 6, descrita no item 3.3.

4.2.10.5 Ligação às Proteínas Plasmáticas

A ligação da PIP às proteínas plasmáticas foi determinada por microdialise. A três animais tratados com ciclofosfamida foi administrada PIP, via i.v. *bolus*, na dose de 240 mg/kg. Foram coletadas amostras de sangue nos tempos 5, 10 e 15 min. Após centrifugação a 3.500 rpm por 15 minutos, separou-se o plasma e este foi colocado em tubo *Eppendorf*.

A sonda de microdialise, previamente calibrada *in vitro*, foi inserida no sistema, sob um fluxo de 1,5 µL/min, e temperatura controlada de 37 °C. Como líquido de perfusão foi utilizado solução de Ringer. Após estabilização por uma hora, foram coletadas 3 alíquotas em intervalos de 20 minutos. As alíquotas de MD e as amostras de plasma total, após processadas como descrito em 4.2.8, foram analisadas por CLAE.

O cálculo da fração livre do fármaco (f_u) foi realizado através da relação entre o presente no dialisado, e presente no plasma total:

$$f_u = \frac{\text{Conc. dialisado}}{\text{Conc. total}} \times 100 \quad (8)$$

4.2.11 Avaliação dos Resultados e Estimativa de Parâmetros Farmacocinéticos

4.2.11.1 Análise Não-Compartimental

Os parâmetros farmacocinéticos para piperacilina foram estimados para cada animal utilizando equações não-compartimentais clássicas descritas por GIBALDI e PERRIER (1989). A constante de eliminação (k_e) foi estimada pela plotagem dos valores de concentração plasmática e tecidual *versus* tempo, em gráfico log-linear. A área sob a curva de concentração plasmática (ASC_{plasma}), a área sob a curva de concentração do fármaco livre no tecido ($ASC_{\text{livre/tec}}$) e as áreas sob a curva no primeiro momento da curva (ASMC) foram calculadas pelo método trapezoidal.

Parâmetros como *clearance* total (CL), tempo de meia vida ($t_{1/2}$), volume de distribuição no *steady state* ($V_{d_{ss}}$), volume de distribuição em função da área abaixo

da curva ($Vd_{\text{área}}$), tempo de residência média no tecido (MRT_{tecido}) e o tempo de residência média plasma (MRT_{plasma}) foram determinados.

As equações utilizadas para os cálculos dos parâmetros não-compartimentais estão descritas a seguir (GIBALDI E PERRIER, 1989):

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{ke} \quad (9)$$

$$CL_{tot} = \frac{D}{ASC_{0-\infty}} \quad (10)$$

$$MRT = \frac{ASMC_{0-\infty}}{ASC_{0-\infty}} \quad (11)$$

$$Vd_{ss} = MRT_{plasma} \cdot CL \quad (12)$$

onde D é a dose administrada e ke obtido através da inclinação dos três últimos pontos da reta do gráfico de log concentração plasmática ou tecidual em função do tempo.

4.2.11.2 Análise Compartmental

A análise compartimental foi realizada utilizando-se o programa de computador SCIENTIST[®] v.2.0. Os dados individuais plasmáticos foram ajustados usando o modelo aberto de dois compartimentos corporais de acordo com a equação abaixo (GIBALDI e PERRIER, 1989):

$$Cp = a.e^{-\alpha.t} + b.e^{-\beta.t} \quad (13)$$

onde C_p é a concentração plasmática total no tempo t , α e β são as constantes híbridas para as fases de distribuição e eliminação, respectivamente, e A e B são os correspondentes interceptos no tempo zero.

A partir da determinação das constantes híbridas do modelo compartimental, calculou-se o volume de distribuição do compartimento central (V_c), volume de distribuição no *steady state* (Vd_{ss}) e volume de distribuição área ($Vd_{\text{área}}$), bem como o *clearance* total (CL) utilizando-se as seguintes equações:

$$V_c = \frac{D}{a + b} \quad (14)$$

$$Vd_{ss} = \frac{(a.\beta^2 + b.\alpha^2)}{(a.\beta + b.\alpha)^2} . D \quad (15)$$

$$Vd_{\text{área}} = \frac{CL}{\beta} \quad (16)$$

$$CL = K_{10} . V_c \quad (17)$$

onde D é a dose administrada.

As concentrações livres de piperacilina no compartimento periférico foram previstas baseando-se nos parâmetros farmacocinéticos obtidos dos dados plasmáticos utilizando-se a equação 18 (DERENDORF, 1989):

$$C_{\text{livre / tecido}} = \frac{f_u . D . k_{21}}{V_c . (\alpha - \beta)} . (e^{-\beta . t} - e^{-\alpha . t}) \quad (18)$$

onde $D \cdot K_{21} / V_c = a \cdot \beta + b \cdot \alpha$, f_u é a fração livre do fármaco no plasma. D é a dose administrada como *bolus* endovenosa e K_{21} é constante de primeira ordem de distribuição do fármaco do compartimento periférico para o compartimento central.

4.2.11.3 Análise Estatística

Os valores dos parâmetros farmacocinéticos obtidos da avaliação não-compartimental e compartimental foram comparados utilizando-se teste “t” pareado. O ajuste dos dados ao modelo compartimental foi realizado utilizando-se o critério de seleção de modelo (MSC) do programa Scientist[®] v. 2.0. O MSC é um critério modificado da função de Aikike, que determina a adequação do modelo aos dados experimentais. O valor do MSC fornece uma informação numérica do ajuste do modelo matemático sendo que, quanto maior seu valor, melhor o ajuste (SCIENTIST, 1995).

4.2.12 Modelagem Farmacocinética - Farmacodinâmica

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos com os experimentos com animais infectados foram utilizados para prever as concentrações livres teciduais obtidas com a administração de piperacilina na dose de 240 mg/kg através da equação 18.

A previsão das concentrações livres teciduais obtidas para a dose de 120 mg/kg foi feita utilizando-se os parâmetros plasmáticos obtidos do trabalho de DINIZ e colaboradores (2002).

A partir da determinação do efeito de morte bacteriana, variação no número de UFC/mL em função do tempo e, sabendo-se as concentrações livres teciduais, pode-se realizar a modelagem dos dados através de modelo PK-PD descrito pela equação 3.

Os testes da adequação desse modelo aos resultados experimentais foram realizados com auxílio do programa de regressão não-linear SCIENTIST v.2.0, observando-se o parâmetro MSC.

Os parâmetros obtidos para esse modelo: k , k_{max} , e EC_{50} , foram comparados aos obtidos com o modelo utilizando-se dados de efeito determinados *in vitro* para o mesmo fármaco, bactéria e inóculo (NOLTING *et al.*, 1996a).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

O método analítico deve apresentar sensibilidade, precisão e exatidão adequados para ser considerado confiável quando aplicado à quantificação de fármacos. A cromatografia líquida, quando validada, é uma técnica bastante adequada para análise de amostras em matrizes biológicas como o plasma.

Nas Figuras 2 e 3 são mostrados, respectivamente, os cromatogramas de piperacilina em plasma de rato e dialisado de tecido.

Os tempos de retenção encontrados foram de 5,96 min para PIP em plasma e 2,85 min para PIP em amostras de dialisado de tecido.

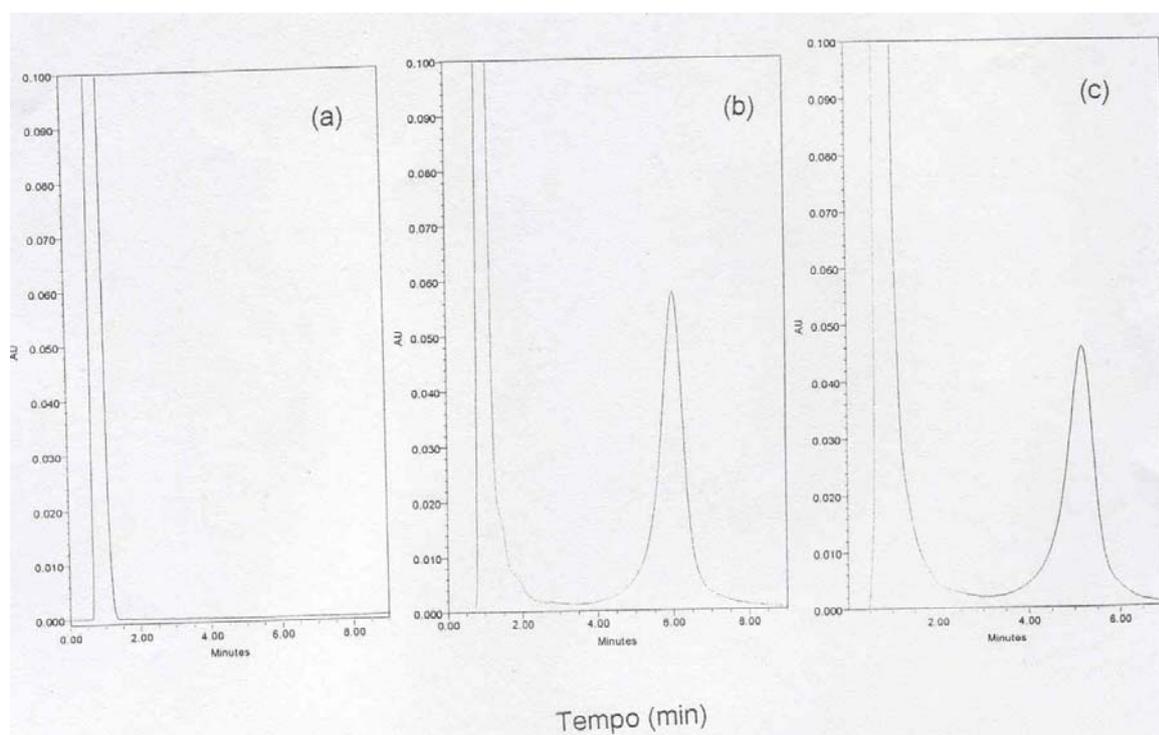


Figura 2. Cromatogramas de CLAE para PIP em plasma de ratos: (a) branco em plasma, (b) amostra da curva de calibração em plasma na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, (c) amostra de plasma de rato obtida experimentalmente, com concentração de PIP determinada como sendo 192,5 $\mu\text{g/mL}$.

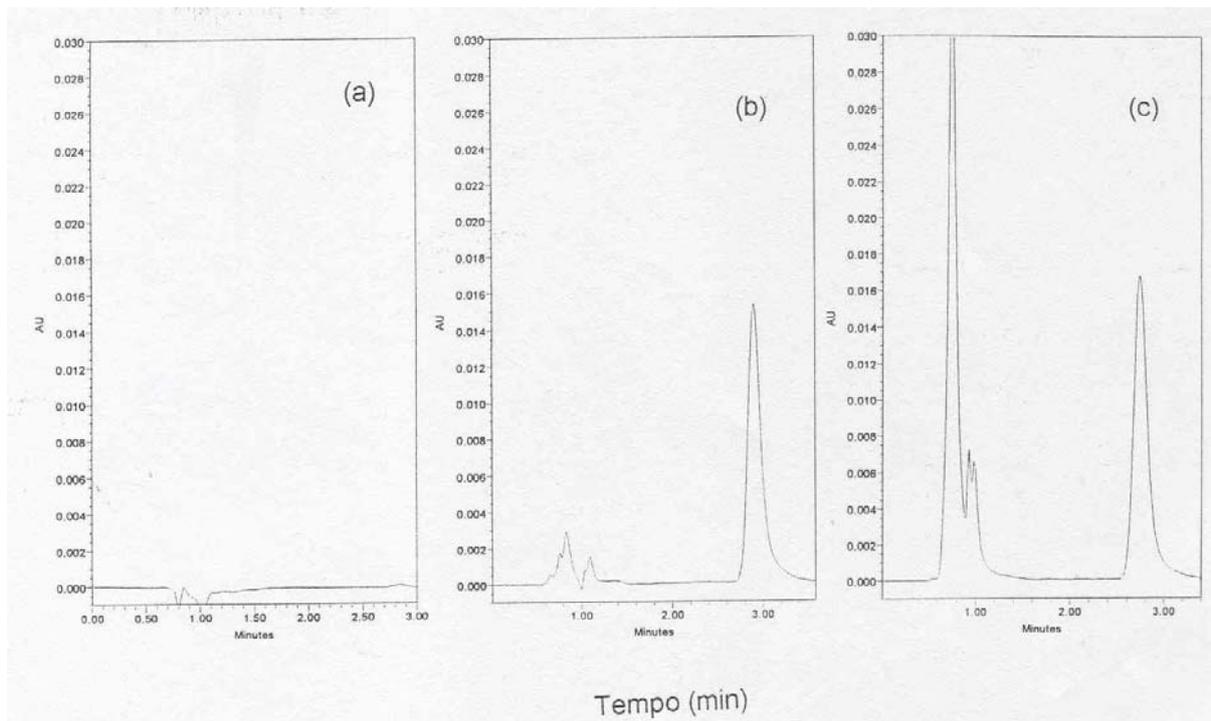


Figura 3. Cromatogramas de CLAE para PIP em microdialisado de ratos: (a) branco da solução de Ringer, (b) amostra da curva de calibração de PIP em Ringer na concentração de 10 µg/mL e (c) amostra de microdialisado de tecido obtida experimentalmente com concentração de PIP calculada como sendo 9,5 µg/mL.

A metodologia analítica para doseamento da piperacilina em plasma por cromatografia líquida foi validada através da avaliação da linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e limite de quantificação (*Guidance* – FDA, 2001).

5.1.1 Linearidade

O *Guidance* – FDA (2001) define como linearidade, a relação linear verificada através da avaliação de uma determinada faixa de concentração, com determinada metodologia analítica.

A média das nove curvas de calibração em plasma utilizadas para a validação da metodologia analítica por CLAE está representada na Figura 4, com sua respectiva equação da reta e o valor do coeficiente de correlação (r).

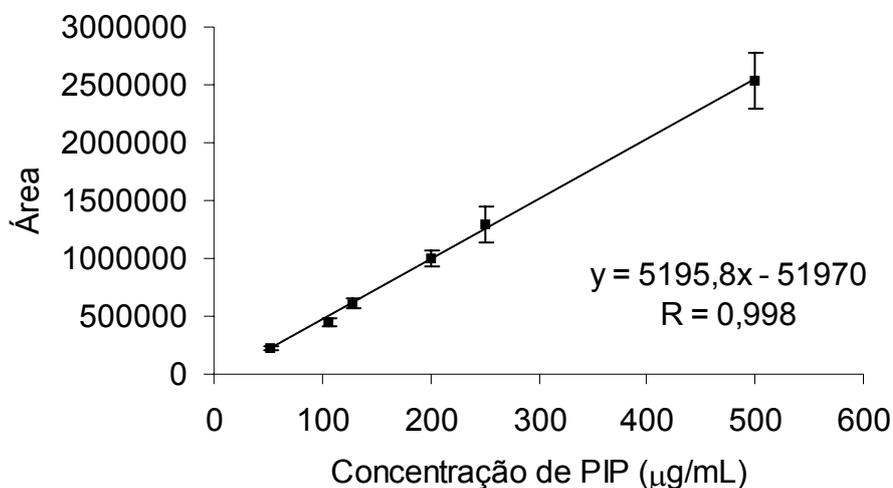


Figura 4. Média das nove curvas de calibração em plasma utilizadas na validação da metodologia por CLAE para piperacilina

Os coeficientes de correlação das curvas de calibração em plasma, preparadas como descrito em 4.2.8, foram calculados individualmente para todas as curvas utilizadas na validação. Os valores dos coeficientes estão listados na Tabela 3.

Tabela 3. Coeficientes de correlação das curvas de calibração de PIP em plasma usadas na validação da metodologia de CLAE.

Dias	Dia 1			Dia 2			Dia 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Coeficiente de correlação (r)	0,999	0,997	0,999	0,997	0,998	0,993	0,999	0,998	0,999

Todos os coeficientes de correlação obtidos apresentaram valores iguais ou superiores a 0,993. O menor valor de correlação aceitável na validação de metodologia analítica para amostras biológicas é de 0,95, de acordo com o *Guidance – FDA (2001)*.

Outro critério utilizado para avaliar a linearidade da curva de calibração considera o coeficiente de variação das amostras. Para o limite de quantificação (LQ) este valor deve ser menor ou igual a 20%, e para o restante das amostras, menor ou igual a 15 %.

Os valores dos coeficientes de variação intradia e interdia das médias das amostras utilizadas na validação do sistema cromatográfico estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4. Coeficientes de variação intradia e interdia das médias das amostras da curva de calibração de PIP em plasma obtidas por CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	CV % intradia			CV % interdia
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média dos Dias
27,5	18,51	12,34	14,25	6,41
52,5	9,95	9,40	9,73	5,96
105	8,79	11,72	2,29	8,97
127,5	4,28	2,27	2,60	1,50
200	1,93	3,62	4,86	2,56
250	3,50	5,99	1,46	5,02
500	0,63	0,65	0,37	0,61

Pode-se observar que os valores dos coeficientes de variação obtidos estão dentro dos limites estabelecidos pelo *Guidance-FDA* (2001), demonstrando que o método analítico é linear na faixa de concentração adotada.

5.1.2 Repetibilidade e Precisão Intermediária

A repetibilidade e a precisão intermediária são os dois testes utilizados para a avaliação da precisão do método analítico. Estes parâmetros descrevem a proximidade das medidas individuais da concentração do fármaco quando o procedimento analítico é aplicado repetidas vezes para múltiplas alíquotas de uma mesma matriz biológica.

A repetibilidade foi avaliada através do coeficiente de variação intradia das três amostras utilizadas como controles de qualidade e a precisão intermediária através da avaliação dos coeficientes de variação interdia destes mesmos controles.

Os coeficientes de variação intradia e interdia, utilizados para a análise destes parâmetros estão listados na Tabela 5.

Tabela 5. Coeficientes de variação intradia e interdia das médias das três amostras controles utilizadas para a curva de calibração de PIP em plasma.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	CV % intradia			CV % interdia
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média dos Dias
75	5,49	1,12	4,29	2,24
150	7,44	2,84	6,84	1,46
400	0,41	4,59	4,89	0,13

Os valores dos coeficientes interdia e intradia devem ser inferiores a 15 % ao longo da curva de calibração, de acordo com o *Guidance-FDA* (2001). Deste modo, pode-se observar que os valores encontrados estão de acordo com esta especificação. O mesmo pode ser observado para a precisão intermediária, que mostra valores de coeficiente de variação interdia inferiores a 15% para os três controles de qualidade.

5.1.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico descreve a proximidade dos resultados das análises ao valor real da concentração do fármaco na amostra, sendo determinada pela análise de amostras com quantidades conhecidas do analito em questão.

Na Tabela 6 pode-se visualizar as concentrações experimentais médias e a exatidão, em relação às concentrações teóricas, das amostras de controle de qualidade utilizadas para avaliar a metodologia analítica.

De acordo com o *Guidance – FDA* (2001), a variação entre o valor real e o valor teórico das amostras deve se manter em torno de 15 % para um mínimo de 5 determinações. Pode-se observar que a exatidão calculada para todas as amostras não teve variação superior a 7,4%, o que indica que o método utilizado é exato para a faixa de concentração testada.

Tabela 6. Exatidão das três amostras de controle de qualidade utilizadas para a curva de calibração de PIP em plasma de ratos e as concentrações médias calculadas com seus respectivos desvios padrões.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Dia 1	Dia 2	Dia 3
	Exatidão (%) (Conc. \pm DP)	Exatidão (%) (Conc. \pm DP)	Exatidão (%) (Conc. \pm DP)
75	105,5 (79,1 \pm 4,5)	101,1 (75,8 \pm 4,4)	104,3 (78,2 \pm 3,2)
150	107,4 (161,2 \pm 0,8)	97,2 (145,7 \pm 8,6)	106,8 (160,3 \pm 5,8)
400	99,6 (398,4 \pm 3,3)	95,4 (381,6 \pm 2,5)	104,9 (419,6 \pm 16,5)

5.1.4 Limite de Quantificação

Para as amostras de plasma, o limite de quantificação determinado foi de 27,5 $\mu\text{g/mL}$, sendo que os coeficientes de variação interdia para estas amostras foram, em média, iguais a 6,41 % , quando a variação máxima aceitável é de 20 %.

A validação da metodologia analítica por CLAE para as amostras de dialisado de tecido não foi realizada porque a metodologia para análise das amostras de plasma, que poderia apresentar maiores dificuldades de validação, por tratar-se de matriz biológica mais complexa, apresentou resultados adequados. Dessa forma, por tratarem-se de amostras que não apresentam maiores interferentes, conforme podemos observar na Figura 2, considerou-se desnecessário este procedimento. Todas as amostras de dialisado foram analisadas contra curvas de calibração preparadas no mesmo dia, e apresentaram coeficientes de correlação sempre iguais ou superiores a 0,999.

5.2 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DA IMUNODEPRESSÃO NOS ANIMAIS

A contagem de leucócitos totais foi realizada nos animais tratados com ciclofosfamida e nos animais controle, conforme descrito em 4.2.1. O resultado das contagens médias totais de leucócitos no grupo tratado foi de $240 \pm 40 \text{ cel/mL}$ e no grupo controle essa média foi igual a $11.400 \pm 1.200 \text{ cel/mL}$.

A contagem diferencial não foi possível, devido a escassez de células nas amostras, no entanto o resultado da contagem total é suficiente para caracterizar

uma granulocitopenia severa (< 300 leucócitos/mL), conforme descrito na literatura por VOGELMAN e colaboradores em 1989.

Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados através de teste “t” de Student não-pareado ($\alpha = 0,05$), e mostraram-se significativamente diferentes, o que evidencia que a metodologia empregada foi eficaz na indução da granulocitopenia.

5.3. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO IN VIVO

O conhecimento da constante de geração bacteriana (k) *in vivo* da *E. coli* ATCC 25922 é de fundamental importância neste trabalho pois, conforme discutido em 3.1, na ausência do fármaco, o crescimento bacteriano, ou seja, a variação do número de colônias no local da infecção em função do tempo (dN/dt) é função direta da constante de geração bacteriana (k) e do número de unidade formadoras de colônia presentes no inóculo. A Figura 5 mostra a curva de crescimento bacteriano.

A constante de geração bacteriana (k) foi calculada pela inclinação da reta entre os tempos de 3 e 9 horas (fase de crescimento log linear), pois como pode ser observado na Figura 5, houve uma diminuição do número de bactérias entre zero e três horas, o que pode ser atribuído a adaptação do microrganismo ao novo meio no qual foi inserido. Após 9 horas observou-se a formação de um platô, que pode estar relacionado a saturação do músculo pela bactérias.

O valor de k , para estas condições experimentais foi igual a $0,762 \text{ h}^{-1}$, com um tempo de geração bacteriano *in vivo* de aproximadamente 54 minutos.

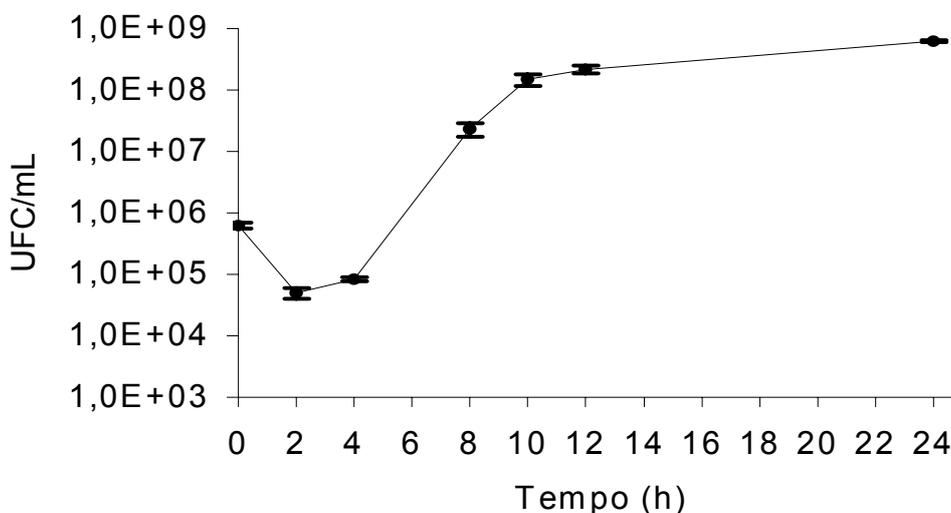


Figura 5. Curva de crescimento bacteriano *in vivo* da *Escherichia coli* ATCC 25922 (n = 3 em cada tempo). Pontos representam a média \pm desvio padrão.

Segundo NOLTING e colaboradores (1996a), a velocidade média de crescimento bacteriano *in vitro* para *E. coli* ATCC 25922, com um mesmo inóculo inicial, foi de 46 minutos, o que indica que o crescimento *in vitro* e *in vivo* apresentaram velocidades semelhantes.

A partir do valor de k obtido de cada experimento de farmacodinâmica (n=18) foi realizada uma modelagem, cujo o valor obtido foi de $0,762h^{-1}$. O valor de k foi fixado para os cálculos dos outros parâmetros que compõe a modelagem farmacocinética-farmacodinâmica.

5.4 AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFECCIOSO

Para avaliar a extensão do processo infeccioso, e confirmar a imunodepressão, foram realizadas análises histopatológicas, conforme descrito em 4.2.4.

Os resultados indicaram que não houve disseminação da infecção para outros locais que não fosse o músculo tibial cranial, uma vez que as análises dos pulmões, rins, fígado e sangue não mostraram a presença de bactérias.

Os aspectos histopatológicos dos músculos estriados analisados nos diferentes grupos são mostrados na Figura 6, com ampliação de 400 x e foram obtidas após coloração com hematoxilina/eosina.

Na Figura 6a, pode-se observar o músculo tibial cranial removido de um animal controle (sem bactérias e sem ciclofosfamida), na Figura 6b, observa-se o músculo de um animal imunocompetente infectado por 24 h e na Figura 6c, observa-se o aspecto de um músculo removido de um animal imunodeprimido e infectado por 24 h.

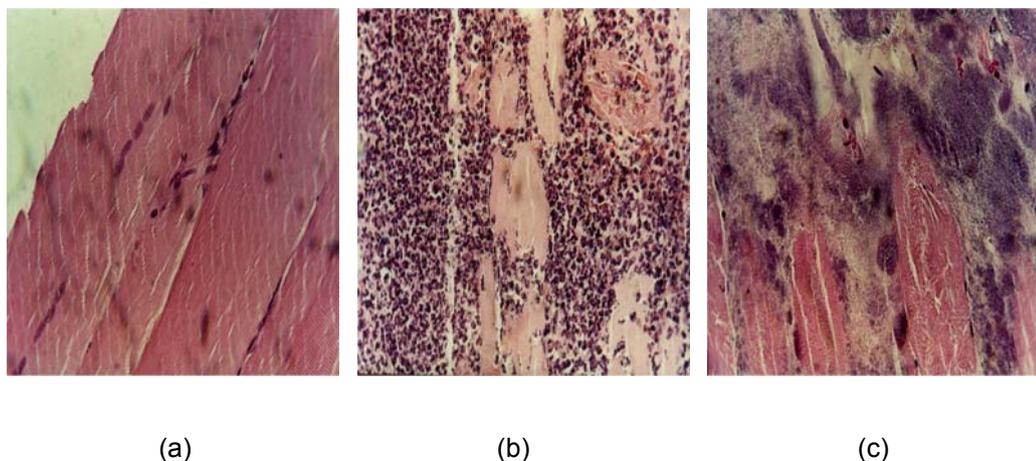


Figura 6. Microfotografia de músculo estriado corado com HE, ampliação de 400 x. (a) animal sadio; (b) animal imunocompetente e infectado por 24 h; (c) animal imunodeprimido e infectado por 24 h.

Na Figura 6a nota-se o aspecto de uma musculatura saudável, sem alterações morfológicas. Observa-se a ausência de neutrófilos e eosinófilos e o corte transversal de alguns vasos sanguíneos. Na Figura 6b observa-se uma intensa migração de neutrófilos e eosinófilos para o músculo, recrutados para combater a infecção no local. Na Figura 6c essas células não são observadas devido ao processo de imunodepressão, que reduz sua população a níveis baixíssimos (<300 leucócitos/campo). Ao invés da migração de células do sistema imune, a Figura 6c mostra a destruição das fibras musculares.

5.5 DETERMINAÇÃO DA LIGAÇÃO A PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

A ligação às proteínas plasmáticas foi determinada através de microdiálise, conforme descrito em 4.2.10.5. Os experimentos foram realizados com os animais tratados com ciclofosfamida e não-infectados.

Foram realizadas coletas em 5, 10 e 15 min após a administração de 240 mg/kg de piperacilina e determinou-se as frações livres no plasma para cada um destes tempos de coleta. Esta análise visou avaliar se a ligação às proteínas plasmáticas da piperacilina era dose-dependente na faixa de concentração estudada, já que a dose administrada situava-se muito acima da preconizada clinicamente (120 mg/kg).

As frações livres médias determinadas de acordo com a equação 8, para cada um dos três tempo de coleta, não mostraram diferenças significativas entre si ($\alpha = 0,05$). Deste modo, a fração livre do fármaco no plasma (f_u) foi determinada como sendo o valor médio dos três tempos de coleta, ou seja, a média de 9 determinações no período de 5 a 15 min, sendo seu valor igual a $0,69 \pm 0,18$ %. Os resultados mostram que a PIP não apresenta ligação a proteínas plasmáticas concentração dependente na faixa de 1100 a 800 $\mu\text{g/mL}$, correspondente as concentrações totais avaliadas neste intervalo de tempo de coleta.

A comparação entre os valores encontrados neste trabalho com ratos granulocitopênicos ($0,69 \pm 0,18$ %) e os relatados por NOLTING e colaboradores (1996b) com ratos saudáveis, $0,58 \pm 0,10\%$ e $0,53 \pm 0,76$ % para as doses de 60 e 120 mg/kg, respectivamente, evidencia que na dose de 240 mg/kg de piperacilina houve aumento da fração livre. Este aumento, no entanto, não pode ser atribuído a presença da ciclofosfamida, uma vez que os estudos apresentados por DINIZ e colaboradores (2002), demonstraram que a ligação da piperacilina a proteínas plasmáticas em ratos imunocomprometidos, na dose de 120 mg/kg, é igual a $0,53 \pm 0,11$, muito semelhante ao valor encontrado por NOLTING e colaboradores (1996b). O valor determinado para a dose de 240 mg/kg é significativamente maior que o determinado para ratos infectados que receberam a dose de 120 mg/kg, nos mesmos tempos de coleta (DINIZ *et al.*, 2002).

Desse modo, pode-se atribuir o aumento observado na fração livre do fármaco à dose administrada, uma vez que esta foi muito superior a utilizada na clínica. Provavelmente ocorre uma saturação das proteínas plasmáticas, e a fração livre, por conseqüência direta, aumenta. A ausência da variação na fração livre em função da variação de concentração plasmática total (5 a 15 minutos de coleta) para a dose de 240 mg/kg pode ser atribuída ao fato de que não houve tempo suficiente para que o equilíbrio se restabelecesse, e a ligação às proteínas voltasse aos níveis normais observados para outras doses.

5.6 CALIBRAÇÃO DAS SONDAS DE MICRODIÁLISE

A calibração das sondas de MD foi realizada *in vitro*, antes de cada experimento, e *in vivo*, utilizando-se a técnica de retrodiálise. As concentrações livres teciduais individuais foram corrigidas de acordo com a calibração *in vivo* da sonda utilizada no respectivo experimento.

A média percentual do valor da recuperação *in vitro* foi de $14,2 \pm 3,4$ %, sendo estes valores indicativos da integridade e bom funcionamento das sondas, utilizadas nos experimentos.

A média percentual do valor de recuperação obtido pela calibração *in vivo* por retrodiálise foi de $13,5 \pm 3,7$ %.

Os valores percentuais de recuperação da sonda determinados pelas calibrações *in vivo* e *in vitro* são semelhantes e, de acordo com BENVENISTE (1989), os resultados encontrados são coerentes uma vez que a taxa de recuperação *in vivo*, geralmente, é menor ou igual à taxa de recuperação *in vitro*, devido a complexidade da matriz que pode diminuir a permeabilidade do fármaco na sonda.

NOLTING e colaboradores (1996b) determinaram as taxas de recuperação de sondas de microdiálise, utilizando piperacilina como fármaco modelo. As recuperações *in vitro* foram avaliadas com diferentes concentrações do calibrador (50, 100, 300 e 500 µg/mL) para fins de determinar se essas taxas variavam em função da concentração do meio externo. As recuperações *in vivo* foram

determinadas em animais sadios. Os valores encontrados para as recuperações *in vitro* e *in vivo*, foram de $10,2 \pm 0,3$ % e $10,1 \pm 0,9$ %, respectivamente. As taxas de recuperação *in vitro* não variavam em função da concentração do meio externo, o que permite que a recuperação *in vitro* seja determinada em um valor de concentração único.

As taxas de recuperação da piperacilina em tecido infectado foram avaliadas por DINIZ e colaboradores (2002). Os animais infectados com *Escherichia coli* ATCC 25922 (inóculo de 10^6 UFC/mL), tiveram as taxas de recuperação determinadas por retrodiálise. Os valores encontrados para as taxas de recuperação *in vitro* e *in vivo* foram de $19,5 \pm 8,2$ % e $13,5 \pm 5,0$ %, respectivamente.

Os resultados obtidos corroboraram as observações de DINIZ e colaboradores (2002) de que o processo infeccioso não altera a capacidade de recuperação das sondas de microdiálise, nas condições experimentais utilizadas.

5.7 AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DA PIPERACILINA

A farmacocinética da piperacilina foi avaliada na dose de 240 mg/kg. Essa avaliação se fez necessária porque este fármaco apresenta farmacocinética não-linear, especialmente em altas doses, alterando seus parâmetros de eliminação em função da dose administrada (MORRISON e BATRA, 1979).

5.7.1 Avaliação Farmacocinética Não-Compartimental

O perfil de concentração plasmática total da PIP na dose de 240 mg/kg pode ser observado na Figura 7. Os parâmetros plasmáticos e teciduais da análise farmacocinética não-compartimental estão dispostos nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

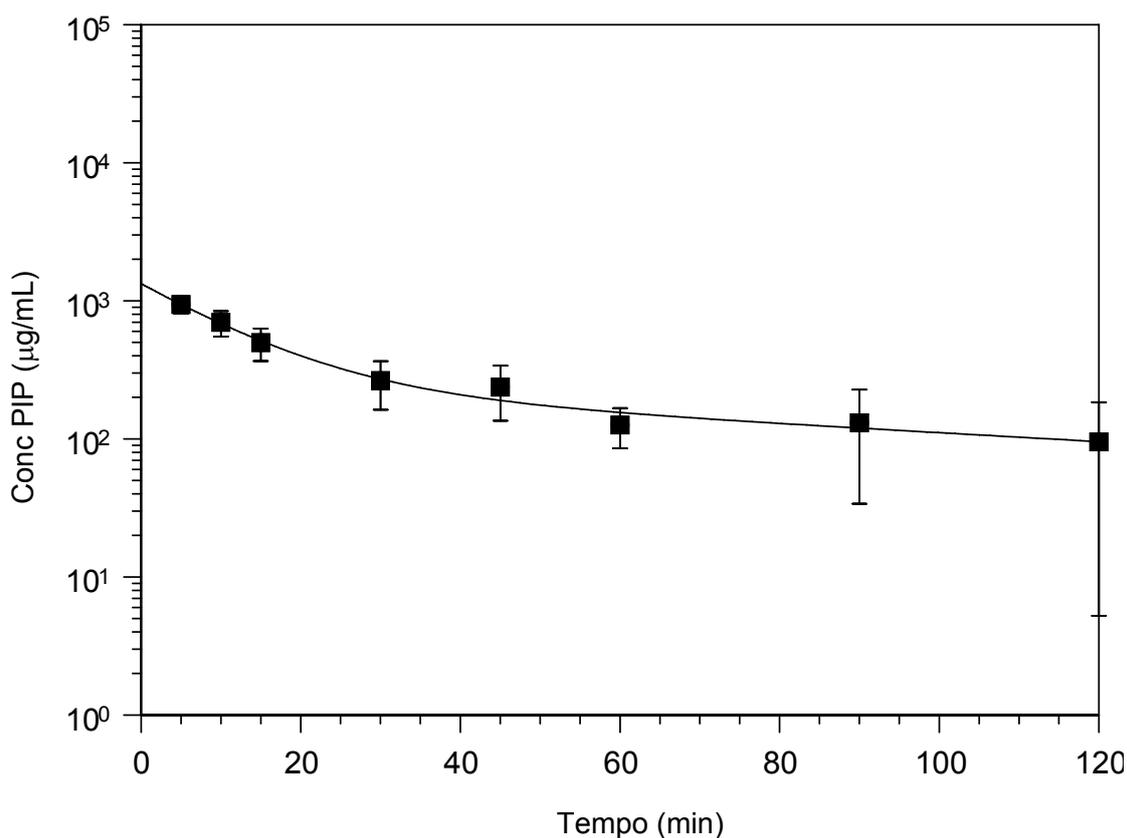


Figura 7. Perfil de concentração plasmática por tempo após administração *i.v. bolus* de PIP 240mg/kg (n = 7). Pontos representam a média \pm desvio padrão.

Tabela 7. Parâmetros farmacocinéticos não-compartimentais obtidos para o perfil de concentração plasmática total após administração *i.v. bolus* de PIP 240 mg/kg (n = 6) a ratos Wistar machos (média \pm dp).

Parâmetros	Dose de 240 mg/kg
k_e (min^{-1})	0,018 \pm 0,003
$t_{1/2}$ (min)	40 \pm 8
CL (L/h/kg)	0,46 \pm 0,21
Vdss (L/kg)	0,30 \pm 0,06
ASC _{0-∞} plasma (µg*min/mL)	30996 \pm 1456
MRT (min)	39 \pm 7

Os parâmetros não-compartimentais plasmáticos para a dose de 240 mg/kg foram semelhantes aos relatados por DINIZ e colaboradores (2002) para animais igualmente infectados e imunodeprimidos avaliados na dose de 120 mg/kg. O tempo

de meia vida plasmático da PIP foi 40 ± 8 min e o obtido por DINIZ e colaboradores (2002) foi de 52 ± 50 .

O valor de *clearance* encontrado para as duas doses foi muito semelhante, sendo igual $0,46 \pm 0,021$ L/h/kg e $0,35 \pm 0,12$ L/h/kg, para as doses de 240 mg/kg e 120 mg/kg, respectivamente. A similaridade nestes dois parâmetros ($t_{1/2}$ e CL) indica que o fármaco foi depurado na mesma velocidade no plasma, independente da dose.

Pode-se observar que houve uma tendência de aumento no V_{dss} para a dose avaliada, $0,30 \pm 0,06$ L/kg, em relação aos obtidos para a dose de 120 mg/kg, que foram iguais a $0,22 \pm 0,16$ L/kg (DINIZ *et al.*, 2002) apesar de não haver diferença sinigificativa. Esta tendência poderia sugerir que a PIP se distribui mais nos tecidos na dose de 240 mg/kg. Este aumento do volume de distribuição no *steady state* (V_{dss}) para a dose de 240 mg/kg é coerente com o aumento da fração livre, observado na determinação da ligação a proteínas plasmáticas (item 5.5). A diferença entre estes valores não é estatisticamente significativa devido a grande variabilidade dos parâmetros calculados no grupo 120 mg/kg.

O valor de $ASC_{0-\infty}$ plasma foi superior ao obtido por DINIZ e colaboradores (2002) que determinaram a $ASC_{0-\infty}$ plasma de 20820 ± 7020 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$, para a dose de 120 mg/kg. Este resultado é coerente, uma vez que se espera um aumento dos valores de ASC, com o aumento da dose administrada. No entanto, este aumento não ocorreu de modo linear, uma vez que observou-se um incremento de apenas 50 % na $ASC_{0-\infty}$ plasma com o aumento de dose em 100 %.

Para os valores de MRT, DINIZ e colaboradores (2002) encontraram 44 ± 34 min para a dose de 120 mg/kg, sendo semelhante ao obtido neste trabalho 39 ± 7 min.

Tabela 8. Parâmetros farmacocinéticos não-compartimentais obtidos para o perfil de concentração livre tecidual após administração *i.v. bolus* de PIP 240 mg/kg (n = 6) a ratos Wistar machos (média \pm dp).

Parâmetros	Dose de 240 mg/kg
k_e (min^{-1})	$0,022 \pm 0,001$
$t_{1/2}$ (min)	32 ± 3
$ASC_{\text{livre/tec } 0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)	7046 ± 2146
MRT (min)	39 ± 8

Na comparação dos parâmetros teciduais determinados por DINIZ e colaboradores (2002) com os determinados neste trabalho, pode-se perceber que o fármaco foi eliminado de maneira semelhante ($p < 0,05$) nas duas doses, com valores de k_e iguais a $0,022 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$ e $0,033 \pm 0,014 \text{ min}^{-1}$ para as doses de 240 e 120 mg/kg, respectivamente. Este fenômeno também pode ser observado através dos valores de $t_{1/2}$ dos diferentes grupos. O $t_{1/2}$ da PIP para a dose de 120 mg/kg foi de 24 ± 10 e para 240 mg/kg foi de 32 ± 3 min.

O MRT da PIP na dose de 120 mg/kg foi igual a 38 ± 16 min, um valor semelhante ao calculado para dose de 240 mg/kg, 39 ± 8 min.

Conforme esperado a $ASC_{\text{livre/tec } 0-\infty}$ da dose de 240 mg/kg foi maior que a calculada por DINIZ (2002) para a dose de 120 mg/kg ($3406 \pm 658 \mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$).

A análise estatística pelo teste “t” de *Student* dos parâmetros farmacocinéticos não-compartimentais plasmáticos e teciduais para a dose de 240 mg/kg é mostrada na Tabela 9. Pode-se observar que não houve diferença estatística entre os parâmetros k_e , $t_{1/2}$, e MRT obtidos no plasma e no tecido indicando que o fármaco apresentou velocidades de eliminação semelhantes nos dois compartimentos. Esta similaridade também pode ser observada através do paralelismo das fases de eliminação de plasma e tecido mostrado na Figura 8.

Tabela 9. Resultado da análise estatística pelo teste “t” de *Student* para parâmetros não-compartimentais teciduais e plasmáticos da dose de 240 mg/kg ($n = 6$) ($\alpha = 0,05$).

Parâmetros	Valor de “t” calculado
k_e (min^{-1})	0,843
$t_{1/2}$ (min)	2,325
MRT (min)	0,223

$t_{0,05;12} = 2,570$

5.7.2 Avaliação Farmacocinética Compartmental

Como este trabalho objetivava a previsão das concentrações livres teciduais a partir dos parâmetros obtidos na avaliação compartmental dos dados plasmáticos, para sua posterior utilização na modelagem PK-PD, realizou-se uma análise

compartimental do perfil plasmático, através do modelo aberto de dois compartimentos, com o auxílio do programa de regressão não-linear SCIENTIST® v.2.0. Os resultados obtidos, no entanto, não foram satisfatórios, visto que as concentrações livres teciduais estimadas mostraram-se superiores às concentrações determinadas experimentalmente, através de microdiálise.

Uma segunda abordagem foi utilizada, na qual realizou-se o ajuste simultâneo das concentrações plasmáticas totais e livres teciduais, utilizando-se um fator de proporcionalidade. Desse modo as concentrações plasmáticas foram ajustadas pela equação do modelo de dois compartimentos (equação 13) simultaneamente com as concentrações livres teciduais, através da equação 18 modificada:

$$C_{tec / livre} = \frac{f \cdot fu \cdot (a \cdot \beta + b \cdot \alpha)}{(\alpha - \beta)} \cdot (e^{-\beta \cdot t} - e^{-\alpha \cdot t}) \quad (18)$$

onde f é o fator de proporcionalidade que permite a avaliação das concentrações livres determinadas no tecido. Desse modo, as constantes híbridas a , b , α e β foram obtidas levando-se em consideração os dados plasmáticos e teciduais. O valor de fu utilizado foi de 0,69.

Os ajustes simultâneos foram realizados individualmente para cada animal e as médias dos fatores de ajuste foram utilizadas para realizar o ajuste simultâneo das concentrações médias mostradas na Figura 8. Para os ajustes individuais e médio utilizou-se peso igual a 1 para todos os pontos. Valores de MSC superiores a 1,5 foram observados para todos os ajustes realizados, mostrando a adequação das equações para modelar os dados obtidos experimentalmente.

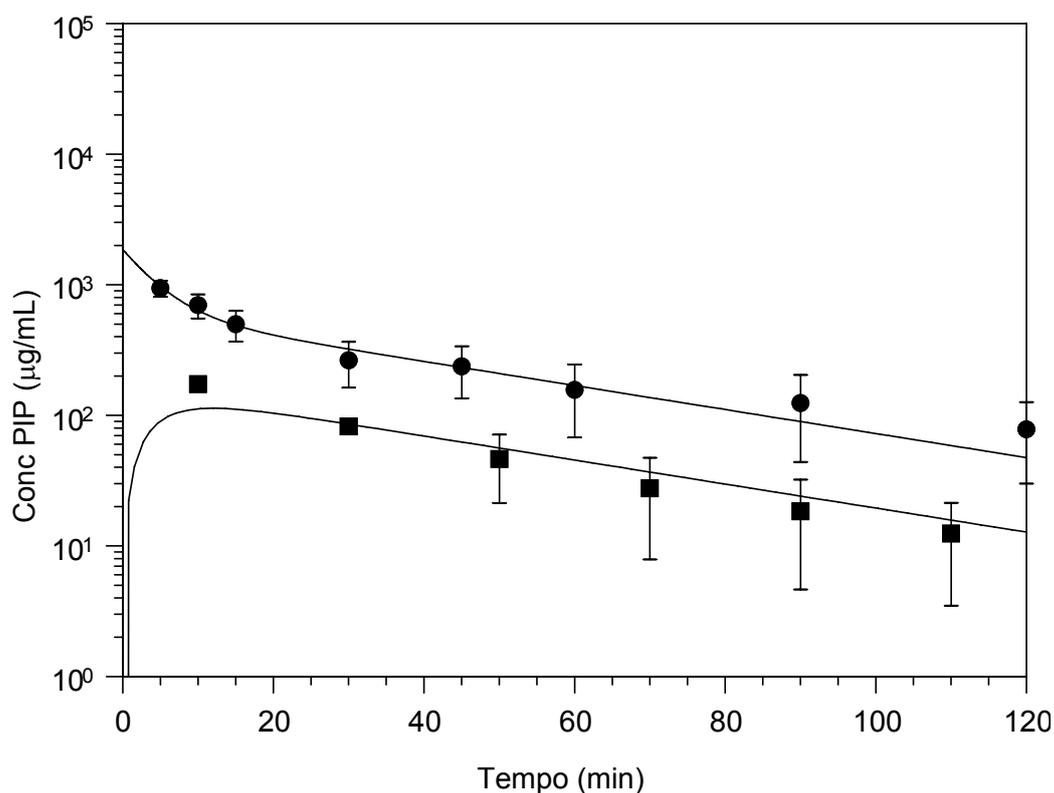


Figura 8. Ajuste simultâneo das concentrações médias plasmáticas totais (●) e livres teciduais (■) após administração *i.v. bolus* da dose de 240 mg/kg de PIP (n=6). Pontos representam média \pm desvio padrão.

Pode-se observar que o ajuste simultâneo descreveu de forma adequada os dados plasmáticos e teciduais na dose avaliada. O fator de proporcionalidade médio determinado foi igual a $0,342 \pm 0,122$.

A necessidade da utilização de um fator de proporcionalidade para permitir a previsão das concentrações livres teciduais de PIP também ocorreu no trabalho realizado por DINIZ e colaboradores (2002), para as doses de 60 e 120 mg/kg utilizando animais infectados e imunodeprimidos. Neste trabalho os fatores de proporcionalidade determinados foram $0,343 \pm 0,090$ e $0,345 \pm 0,101$, para as doses de 120 e 60 mg/kg, respectivamente.

Através do fator de proporcionalidade pode-se prever as concentrações teciduais através das plasmáticas, corrigindo determinados desequilíbrios que possam ocorrer entre o compartimento central e o periférico, que não permitiriam estabelecer uma relação direta entre os dois.

No trabalho realizado por NOLTING e colaboradores (1996b), onde avaliou-se a farmacocinética plasmática e tecidual da piperacilina em animais saudáveis, não houve necessidade da utilização de fator de proporcionalidade, ou seja, os

parâmetros plasmáticos foram capazes de prever as concentrações livres teciduais levando à conclusão que o processo que governa a distribuição tecidual da PIP é a difusão passiva. Os resultados obtidos com animais infectados nos levam a hipótese de que o mecanismo infeccioso e o processo de imunodepressão são os responsáveis pela alteração do equilíbrio entre as concentrações plasmáticas e teciduais, devido à interferência no processo de difusão passiva causadas pelas alterações fisiológicas decorrentes da imunodepressão e infecção.

JOUKHADAR e colaboradores (2001) estudaram a penetração tecidual da piperacilina (musculatura esquelética e tecido adiposo) em seis pacientes com choque séptico, utilizando microdiálise. Os autores observaram que os níveis livres teciduais foram 5 a 10 vezes inferiores às correspondentes concentrações plasmáticas livres, concluindo que o processo infeccioso altera a penetração tecidual deste antibiótico, levando à redução de sua efetividade clínica.

O uso do fator de proporcionalidade já foi relatado previamente para outros fármacos por motivos diversos.

Em trabalho utilizando o antibiótico β -lactâmico, cefaclor, realizado por PEÑA e colaboradores (2001), um fator de proporcionalidade semelhante foi utilizado para ajustar dados plasmáticos e teciduais para as duas doses avaliadas do fármaco (50 e 75 mg/kg), em diferentes tecidos (pulmão e músculo) de animais sadios. As hipóteses levantadas para a utilização do fator de proporcionalidade foram a possível degradação tecidual do fármaco, mecanismo de transporte ativo e/ou a diferença de pH entre tecido e plasma, levando à alteração do processo de distribuição passivo.

FREDDO (2002) utilizou um fator de proporcionalidade para prever as concentrações livres teciduais de norfloxacin, uma quinolona de 2ª geração, a partir das concentrações plasmáticas totais. Neste trabalho foram avaliadas duas doses do fármaco (5 mg/kg e 10 mg/kg) em ratos Wistar sadios. As hipóteses para a falta de equilíbrio foram a penetração celular do fármaco, transporte ativo e/ou degradação tecidual.

Na Tabela 10 são apresentados os parâmetros farmacocinéticos compartimentais médios resultantes do ajuste simultâneos dos dados plasmáticos e teciduais para a dose de 240 mg/kg.

Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos compartimentais determinados após o ajuste simultâneo das concentrações plasmáticas e teciduais obtidas da administração *i.v. bolus* de PIP na dose de 240 mg/kg (n = 6).

Parâmetros	PIP 240 mg/kg
a ($\mu\text{g/mL}$)	1140,5 \pm 135,4
b ($\mu\text{g/mL}$)	599,4 \pm 153,2
α (min^{-1})	0,195 \pm 0,050
β (min^{-1})	0,022 \pm 0,003
Vc (L/kg)	0,148 \pm 0,011
Vdss (L/kg)	0,277 \pm 0,028
Vd _{área} (L/kg)	0,340 \pm 0,062
ASC _{0-∞} ($\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$)	33960 \pm 5033
CL (L/h/kg)	0,43 \pm 0,07
t _{1/2} β (min^{-1})	33 \pm 5
MSC	1,5 - 2,3

As constantes híbridas α e β apresentaram valores iguais a 0,195 \pm 0,050 min^{-1} e 0,022 \pm 0,003 min^{-1} , respectivamente, os quais são muito semelhantes aos determinados por DINIZ e colaboradores (2002) para a dose de 120 mg/kg, 0,190 \pm 0,040 e 0,030 \pm 0,010, respectivamente. O t_{1/2} β determinado também foi similar ao obtido para a dose de 120 mg/kg, cujos valores foram de 26 \pm 13 min.

Os valores calculados para o volume de distribuição no compartimento central (Vc), volume de distribuição no steady-state (Vdss) e volume de distribuição área (Vd_{área}), foram estatisticamente superiores aos determinados por DINIZ e colaboradores para a dose de 120 mg/kg, cujos valores foram 0,090 \pm 0,020; 0,190 \pm 0,08 e 0,160 \pm 0,060 L/kg. Na avaliação compartimental, a tendência de aumento do volume de distribuição observada na análise não-compartimental foi comprovada. O aumento do volume de distribuição deveria levar a um aumento do t_{1/2} β , uma vez que o *clearance* não sofreu alteração. Este resultado, no entanto, não foi observado provavelmente devido a grande variabilidade dos parâmetros determinados para a dose de 120 mg/kg.

Este resultado indica que o fármaco apresentou maior distribuição na maior dose, provavelmente devido ao aumento da fração livre, conforme discutido em 5.5.

O valor do *clearance*, igual a $0,34 \pm 0,10$ L/h/kg para a dose de 120 mg/kg e $0,43 \pm 0,07$ L/h/kg para 240 mg/kg indica que o fármaco é eliminado de maneira semelhante nas duas doses.

O valor de MSC em média igual a 1,5 é um indicativo de que o modelo de dois compartimentos é adequado para descrever os dados experimentais. A análise estatística pelo teste “t” de *Student* ($\alpha = 0,05$) não apresentou diferenças significativas quando compararam-se os parâmetros compartimentais e não compartimentais, confirmando que o modelo que melhor descreve a farmacocinética da PIP é o de dois compartimentos aberto.

5.7.3 Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica

NOLTING e colaboradores (1996a) propuseram um modelo PK-PD para piperacilina (Equação 3), desenvolvido a partir da avaliação do efeito de morte bacteriana em modelo de infecção experimental *in vitro* com *E. coli* ATCC 25922, através da simulação dos perfis de concentração livre tecidual esperados em humanos após a administração do fármaco em diferentes posologias. A faixa de dosagem avaliada pelos autores foi de 30 a 120 mg/kg, encontrando-se dentro da faixa preconizada clinicamente.

Neste trabalho inicialmente avaliou-se os perfis de morte bacteriana em função do tempo na mesma faixa de doses relatada por NOLTING e colaboradores (1996a). No entanto, não foi observado o efeito de morte nas doses de 30 e 60 mg/kg, o que nos levou a escolher uma faixa de doses diferente: 120 a 240 mg/kg, embora maior que a usada na clínica humana. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de que no modelo *in vitro* foram simuladas as concentrações esperadas nos tecidos humanos, onde o $t_{1/2}$ da piperacilina é em torno de 1 h, que é o dobro do observado em ratos. Como a piperacilina tem ação tempo-dependente, essa diferença foi determinante no efeito farmacodinâmico.

Neste trabalho, avaliou-se o efeito da piperacilina em ratos imunodeprimidos e infectados com o mesmo patógeno, utilizando-se os perfis de concentração livre tecidual previstos pelos parâmetros plasmáticos e o fator de proporcionalidade obtidos após a administração de piperacilina *i.v. bolus* nas doses de 120 e 240 mg/kg a animais infectados e imunodeprimidos.

Os parâmetros utilizados na modelagem PK-PD estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros farmacocinéticos utilizados para modelagem PK-PD da piperacilina.

Parâmetros	Dose de 240 mg/kg	Dose 120 mg/kg
a ($\mu\text{g/mL}$)	1140,5	951,14
b ($\mu\text{g/mL}$)	599,4	496,37
α (min^{-1})	0,195	0,19
β (min^{-1})	0,022	0,03
f	0,342	0,343
fu	0,69	0,53

Utilizando-se a Equação 3, procedeu-se a modelagem PK-PD, que foi realizada fixando-se o valor de k (constante de geração bacteriana *in vivo*), em $0,762 \text{ h}^{-1}$, relatado em 5.3.

A fixação do k objetivou uma maior precisão dos parâmetros de farmacodinâmica, EC_{50} e k_{max} , uma vez que o papel da constante de geração bacteriana é fundamental na determinação destes parâmetros.

Os perfis de concentração livre tecidual de piperacilina após a administração da dose de 120 mg/kg e 240 mg/kg, previstos pelos parâmetros plasmáticos, e a modelagem farmacocinética-farmacodinâmica correspondente, são mostrados nas Figuras 9 (4/4h), 10 (6/6h), 11 (8/8h), 12 (4/4h), 13 (6/6h), 14 (8/8h), respectivamente.

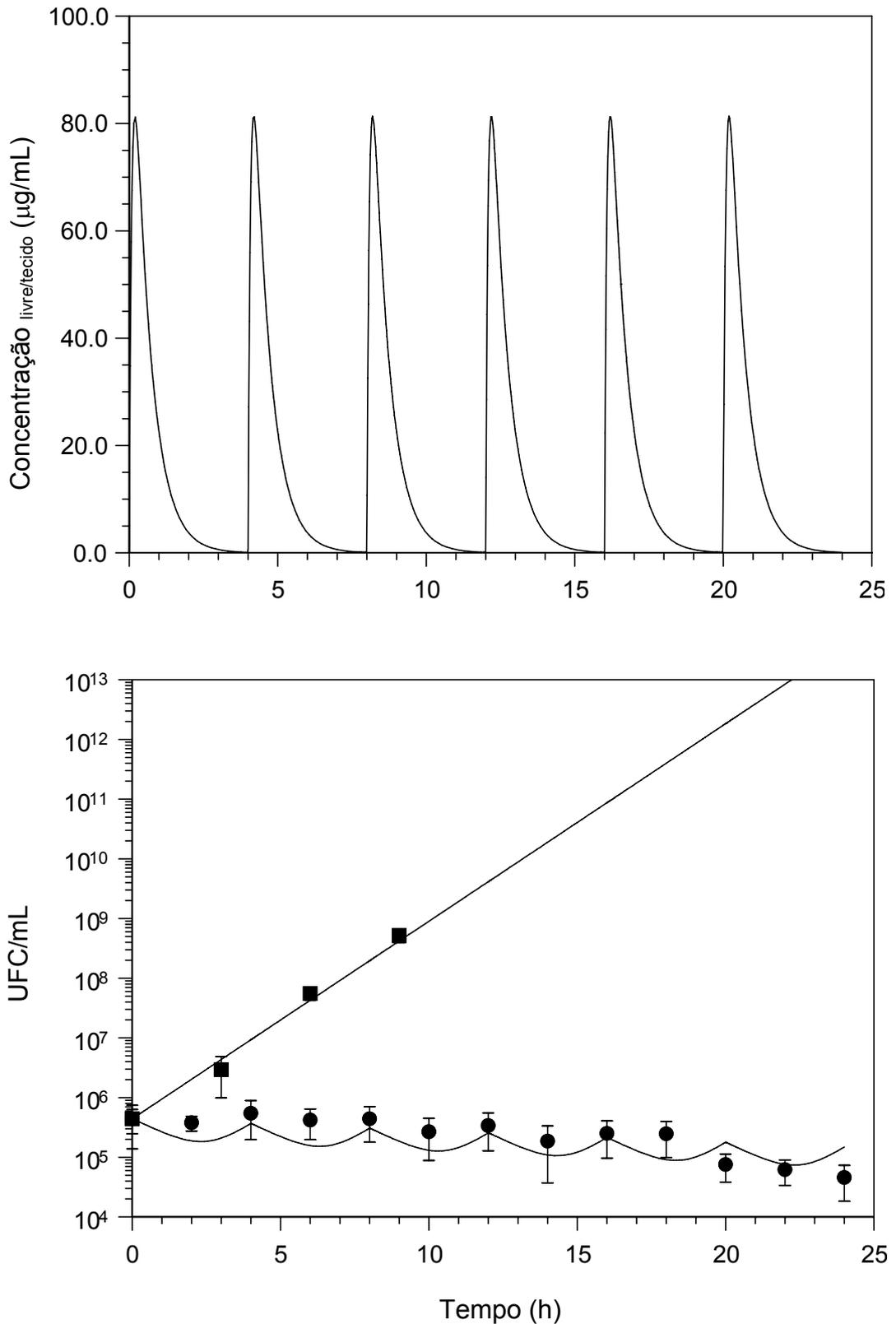


Figura 9. Simulação do perfil de concentração livre tecidual da piperacilina, previsto através dos parâmetros plasmáticos para dose de 120 mg/kg (painel superior). Perfil de morte bacteriana por tempo após administração de PIP 120 mg/kg de 4/4 h modelado utilizando-se a equação 3. Pontos representam a média \pm dp para animais controles (■) e tratados (●), (n = 3/ponto) (painel inferior).

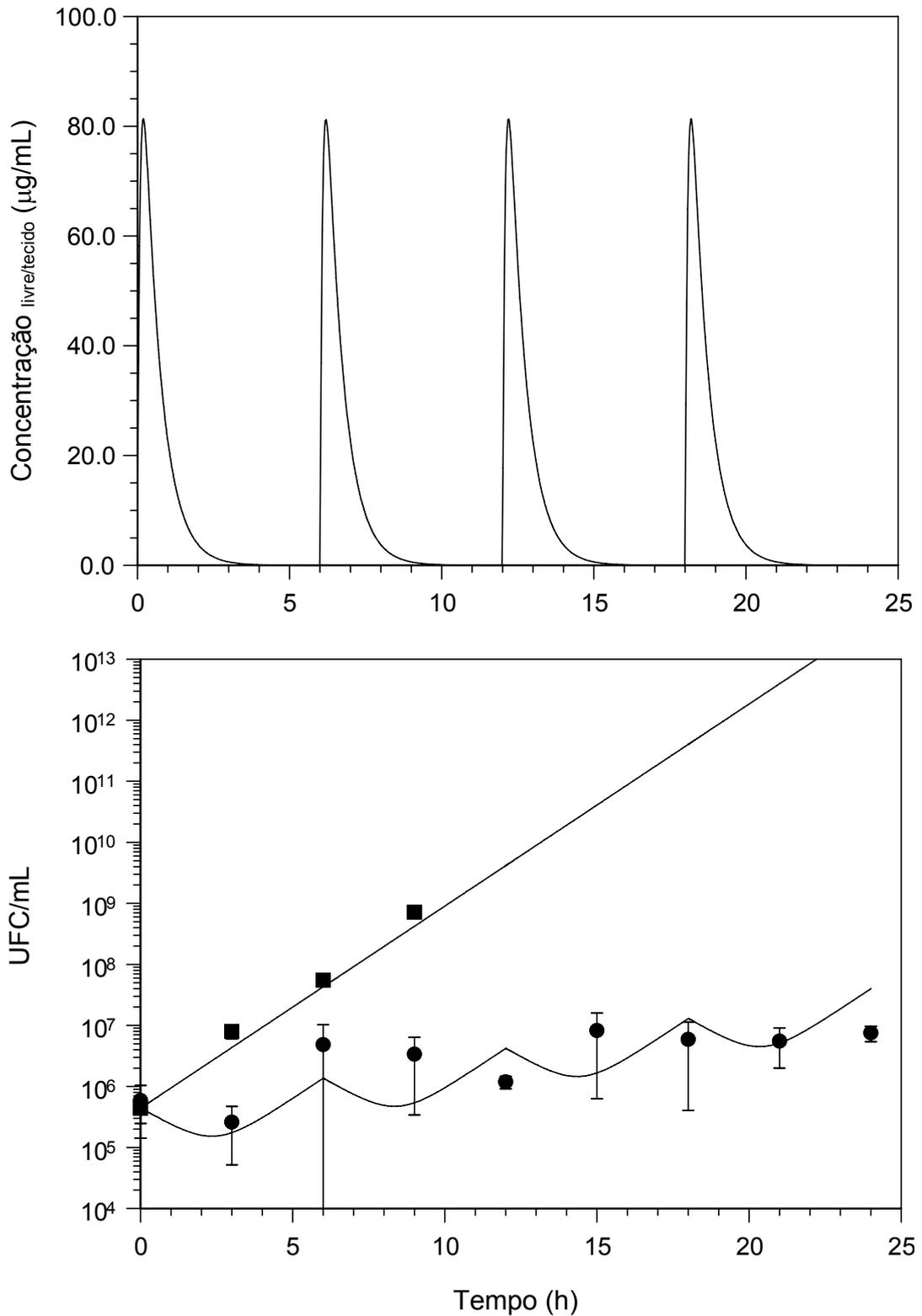


Figura 10. Simulação do perfil de concentração livre tecidual da piperacilina, previsto através dos parâmetros plasmáticos para dose de 120 mg/kg (painel superior). Perfil de morte bacteriana por tempo após administração de PIP 120 mg/kg de 6/6 h modelado utilizando-se a equação 3. Pontos representam a média \pm dp para animais controles (■) e tratados (●), (n = 3/ponto) (painel inferior).

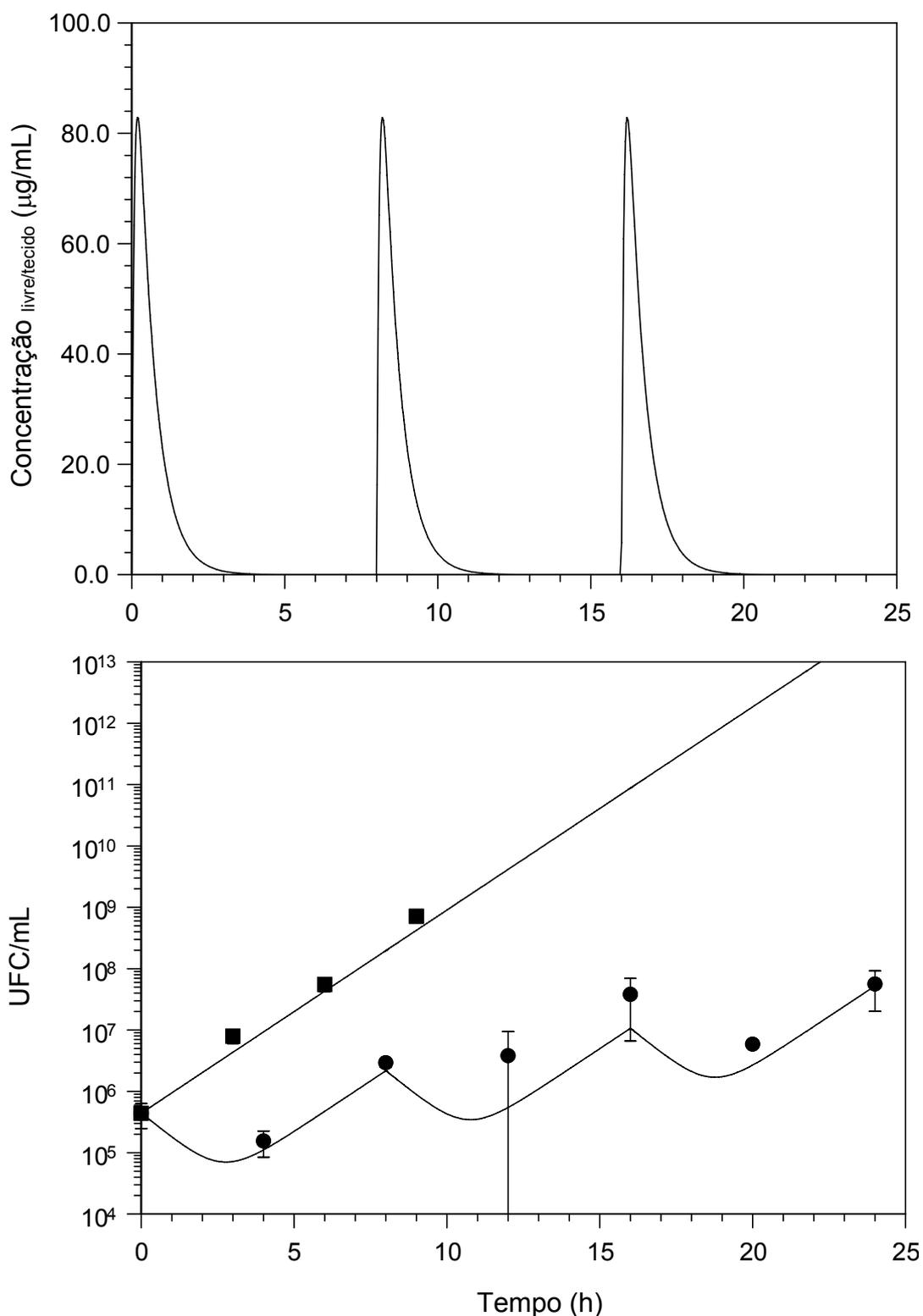


Figura 11. Simulação do perfil de concentração livre tecidual da piperacilina, previsto através dos parâmetros plasmáticos para dose de 120 mg/kg (painel superior). Perfil de morte bacteriana por tempo após administração de PIP 120 mg/kg 8/8h de modelado utilizando-se a equação 3. Pontos representam a média \pm dp para animais controle (■) e tratados (●), (n = 3/ponto) (painel inferior).

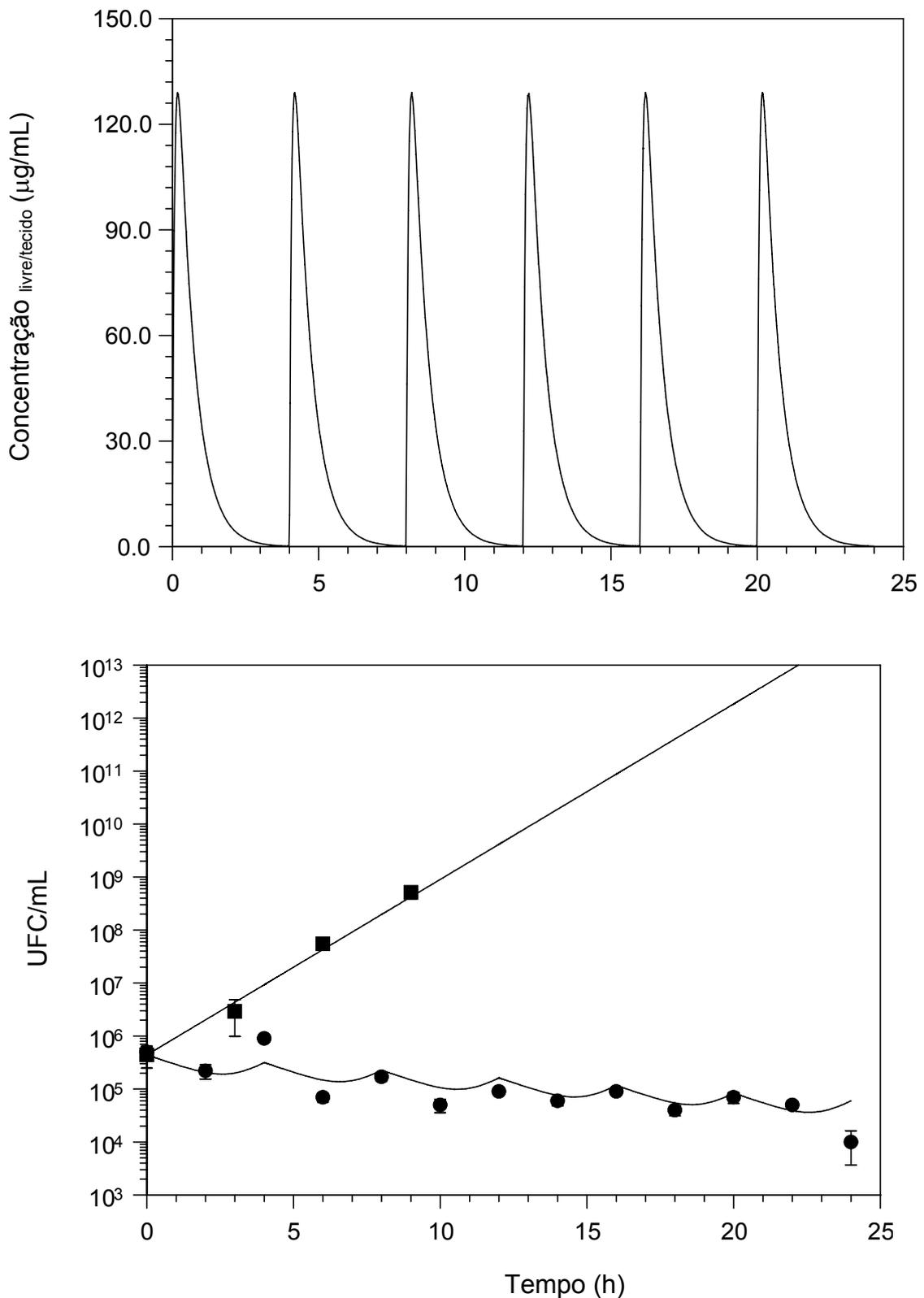


Figura 12. Simulação do perfil de concentração livre tecidual da piperacilina, previsto através dos parâmetros plasmáticos para dose de 240 mg/kg (painel superior). Perfil de morte bacteriana por tempo após administração de PIP 240 mg/kg de 4/4h modelado utilizando-se a equação 3. Pontos representam a média \pm dp para animais controle (■) e tratados (●), (n = 3 /ponto) (painel inferior).

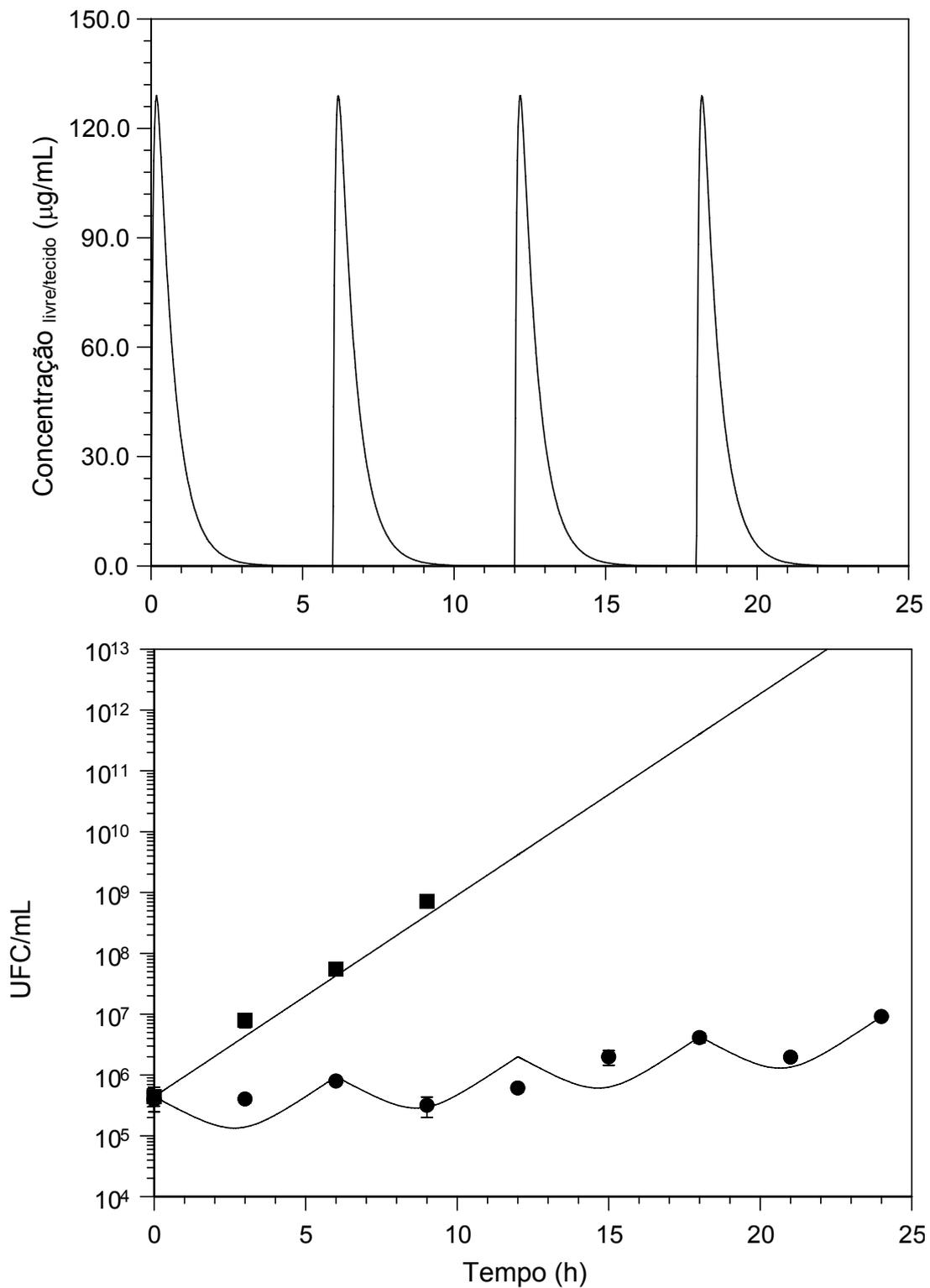


Figura 13. Simulação do perfil de concentração livre tecidual da piperacilina, previsto através dos parâmetros plasmáticos para dose de 240 mg/kg (painel superior). Perfil de morte bacteriana por tempo após administração de PIP 240 mg/kg de 6/6h modelado utilizando-se a equação 3. Pontos representam a média \pm dp para animais controle (■) e tratados (●), (n = 3/ponto) (painel inferior).

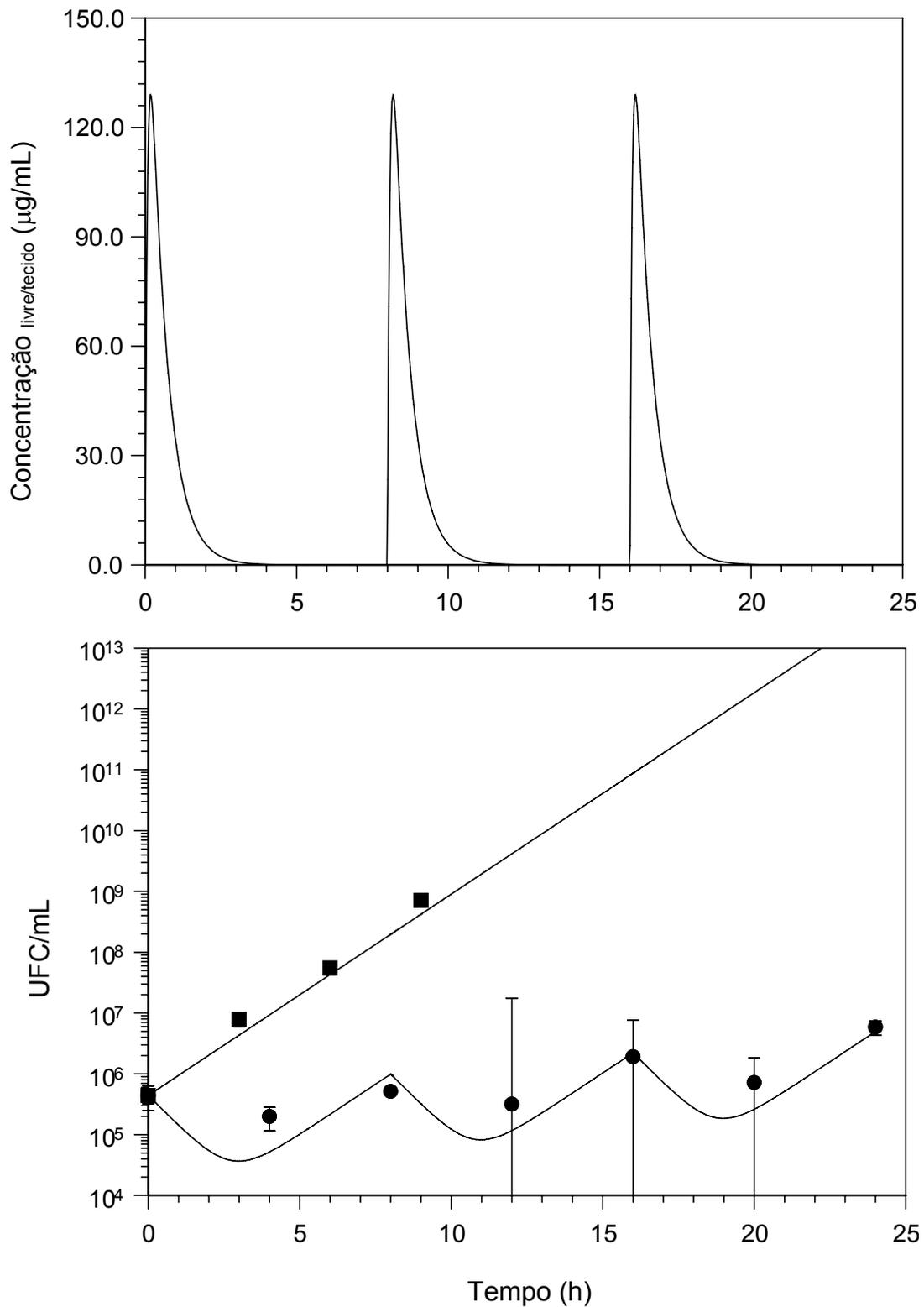


Figura 14. Simulação do perfil de concentração livre tecidual da piperacilina, previsto através dos parâmetros plasmáticos para dose de 240 mg/kg (painel superior). Perfil de morte bacteriana por tempo após administração de PIP 240 mg/kg de 8/8h modelado utilizando-se a equação 3. Pontos representam a média \pm dp para animais controle (■) e tratados (●), (n= 3/ponto) (painel inferior).

Os parâmetros gerados na modelagem farmacodinâmica estão mostrados na Tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros resultantes da modelagem PK-PD da piperacilina nas doses de 120 e 240 mg/kg usando constante de geração bacteriana (k) fixada em $0,762 \text{ h}^{-1}$.

Parâmetro	120 mg/kg			240 m/kg			Média ± dp
	4/4 h	6/6 h	8/8 h	4/4 h	6/6 h	8/8 h	
Intervalo de Dose	4/4 h	6/6 h	8/8 h	4/4 h	6/6 h	8/8 h	
EC ₅₀ (µg/mL)	1,39	1,59	1,04	1,10	1,31	1,41	1,31 ± 0,27
k _{max} (h ⁻¹)	1,31	1,41	1,69	1,20	1,38	1,93	1,38 ± 0,20
MSC	3,03	1,21	0,96	3,07	1,35	1,28	
Coeficiente de correlação (r)	0,99	0,99	0,96	0,99	0,99	0,99	

Na Figura 9 (painel inferior) pode-se observar que não houve uma redução efetiva na população bacteriana durante todo o período de tratamento com a dose 120 mg/kg q4 h. O que se observa é a manutenção da população em torno de 5×10^5 UFC/mL durante as primeiras 20 horas com uma tendência de redução neste número nas quatro horas seguintes.

Na Figura 10 (painel inferior) (120 mg/kg q6h) observa-se que o crescimento bacteriano foi igualmente afetado, mas em menor magnitude do que no regime de administração anterior, com contagens na ordem de 10^7 UFC/mL. O maior efeito de morte é observado em 3 horas, havendo recrescimento da população a partir deste período, com picos em 6 e 15 horas, justamente nos tempos de exposição a concentrações teciduais mais baixas, ou seja, concentrações plasmáticas de vale.

Na Figura 11 (painel inferior) (120 mg/kg q8h) pode-se observar um menor efeito do fármaco no total de 24 horas. Observa-se morte até 4 horas, com recrescimento das bactérias em 8,16 e 24 horas, ou seja, nos tempo de vale das concentrações livres teciduais. A administração da segunda e terceira doses causou uma pequena redução no número de bactérias em 12 e 20 horas.

As Figuras 12 a 14 mostram os mesmos intervalos de dose para a dose de 240 mg/kg. Na Figura 12 (painel inferior) (240 mg q4h) pode-se observar que os picos de crescimento novamente acompanham os vales de concentração livre tecidual, com a população bacteriana mantendo-se em torno de 10^5 UFC/mL durante

todo o período de tratamento, havendo um pequeno aumento no efeito de morte a partir de 24 h. A comparação da Figura 9 com a Figura 12 mostra que o efeito de morte bacteriana foi da mesma ordem de magnitude, apesar da dose ter sido duplicada. Em ambas posologias, não houve uma erradicação do microrganismo do tecido após 24 horas.

Na Figura 13 (painel inferior) (240 mg/kg q6h) observa-se que a população bacteriana continua em crescimento lento, mas progressivo, chegando a um pico de 10^7 UFC/mL em 24 horas. Novamente, os períodos de maior efeito de morte são aqueles em que a concentração livre do antibiótico no tecido está aumentada. A comparação da Figura 13 com a Figura 10 permite visualizar o mesmo efeito para as duas posologias.

Na Figura 14 (painel inferior) (240 mg/kg q8h) nota-se que houve uma redução no número de bactérias em 4 horas, com recrescimento em seguida. A partir desse período a população manteve-se estável, atingindo contagens próximas ao do inóculo inicial (10^5 UFC/mL) e chegando ao limite máximo de 10^6 UFC/mL em 24 horas. Este efeito foi similar ao observado para a dose de 120 mg/kg no mesmo intervalo de dose (Figura 11).

Em toda as posologias investigadas, o modelo PK-PD adequadamente descreveu o efeito de morte e re-crescimento bacteriano em função do tempo. A adequação do modelo aos dados experimentais pode ser observada pelos valores de MSC e coeficiente de correlação obtidos (Tabela 12), bem como pela observação gráfica (Figura 9-14).

Na comparação entre os diferentes intervalos para a mesma dose, pode-se observar um aumento na magnitude do efeito para intervalos menores. Este resultado está de acordo com o descrito na literatura, que classifica os antibióticos beta-lactâmicos, como sendo tempo-dependentes, ou seja, o efeito sobre a morte bacteriana é maior em função do tempo de exposição da bactéria a concentrações acima da CIM. Isto não significa que a concentração do fármaco não é importante para o efeito bactericida, apenas que sua contribuição é limitada quando comparada ao tempo de exposição da bactéria ao fármaco. (NIGHTINGALE, 1994).

Esse efeito tempo-dependente, no entanto, poderia ser claramente observado nos perfis de morte bacteriana, se intervalos de dose menores que q4h fossem utilizados, devido ao curto tempo de meia-vida da piperacilina em ratos, em torno de 30 minutos.

Os parâmetros farmacodinâmicos k_{max} e EC_{50} (Tabela 12) não variaram com o regime posológico adotado. O mesmo comportamento foi observado *in vitro* (NOLTING *et al.*,1996b) levando à conclusão de que estes parâmetros são característicos da interação fármaco x bactéria específica e independentes da dose e intervalo de dose utilizados. Baseado neste resultado pode-se fazer a média dos parâmetros farmacodinâmicos obtidos: k_{max} $1,38 \pm 0,20 \text{ h}^{-1}$ e EC_{50} $1,31 \pm 0,27 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

O valor de EC_{50} médio obtido ($1,31 \pm 0,27 \text{ } \mu\text{g/mL}$) foi inferior ao observado para o modelo quando a piperacilina foi avaliada contra a mesma bactéria *in vitro* ($5,17 \pm 1,81 \text{ } \mu\text{g/mL}$) (NOLTING *et al.*, 1996b). Este resultado indica que foi necessária uma concentração maior de piperacilina para promover 50 % do efeito máximo de morte no modelo *in vitro*. No modelo *in vitro*, no entanto, obteve-se a erradicação do microrganismo a partir de 10 h, com a dose de 120 mg/kg q4h. No modelo *in vivo*, por outro lado, a erradicação não foi observada em até 24 horas. Deste modo, o menor valor de EC_{50} determinado *in vivo* não corresponde ao mesmo nível de efeito máximo obtido *in vitro*.

A constante de velocidade de morte máxima das bactérias relatada *in vitro*, $3,19 \pm 1,39 \text{ h}^{-1}$, foi maior que a observada *in vivo* ($1,39 \pm 0,20 \text{ h}^{-1}$), indicando que o tempo para obter o efeito máximo, ou seja erradicação bacteriana no tecido, é maior *in vivo*.

As diferenças obtidas nos parâmetros da modelagem PK-PD *in vitro* e *in vivo* podem estar relacionadas tanto à variação farmacocinética dos experimentos realizados quanto aos diferentes ambientes de infecção *in vitro* e *in vivo*.

NOLTING e colaboradores (1996b) simularam *in vitro* os perfis de concentração livre tecidual da piperacilina esperados em humanos, utilizando tempo de meia-vida de uma hora. No presente trabalho foram utilizados os dados reais de ratos Wistar infectados experimentalmente, com tempo de meia-vida de eliminação tecidual do fármaco em torno de 30 minutos. Essas diferenças nos tempos de meia-vida implicaram numa redução no tempo de exposição ao antibiótico, em relação ao observado em humanos, que se refletiu nas observações de efeito através dos parâmetros EC_{50} e k_{max} .

Para compreender as diferenças de ambiente *in vitro* e *in vivo*, devemos considerar que: a) bactérias comportam-se de maneiras distintas *in vitro* e *in vivo*, podendo alterar seu comportamento em relação ao crescimento de acordo com as

circunstâncias que se encontram. Trabalhos relatados na literatura descrevem a alteração na produção de substratos quando a bactéria se encontra *in vivo*, em comparação com o crescimento *in vitro*, que as tornariam menos susceptíveis à ação de antibióticos que atuam sobre a síntese da parede celular, como os β -lactâmicos, por exemplo (SMITH, 1998); b) a exposição ao antibiótico é bem menor no tecido, do que num modelo *in vitro*. *In vitro* a bactéria encontra-se em solução, ficando totalmente susceptível ao fármaco enquanto que no tecido, esta pode se aderir as células e fibras presentes, criando sítios de proteção que tornam mais difícil o acesso do fármaco (KONEMAN *et al.*, 2001).

Em resumo, os resultados mostraram que o modelo de E_{max} -modificado utilizado neste trabalho foi capaz de prever a morte das bactérias em função do tempo para todos os intervalos e doses avaliados *in vivo*, podendo ser utilizado para simulações de posologias contra esta cepa bacteriana não investigadas experimentalmente. O emprego deste modelo PK-PD para otimizar terapias com este antibiótico ainda não pode ser extrapolado para a clínica, em função das limitações existentes em uma infecção experimental em animais farmacologicamente imunodeprimidos. Para utilização na prática clínica, este modelo precisa ser avaliado, na seqüência, em situações de infecção real em humanos bem com outros patógenos utilizando-se diferentes antibióticos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A validação da metodologia analítica para cromatografia líquida de alta eficiência mostrou linearidade e repetibilidade adequadas para as amostras de plasma e dialisado de tecido. Os limites de quantificação observados foram de 27,5 µg/mL e 0,5µg/mL, respectivamente;
- A ciclofosfamida administrada a ratos Wistar machos, nas doses de 150 e 100 mg/kg, 5 dias e 1 dia antes do experimento induziu granulocitopenia severa (< 300 leucócitos/campo);
- O tempo de geração da *Escherichia coli in vivo*, nas condições experimentais utilizadas foi de 54 minutos, não diferindo do observado por NOLTING e colaboradores (1996b) *in vitro*, que foi de 46 minutos;
- As avaliações histopatológicas confirmaram que o processo de imunodepressão reduziu substancialmente a migração de neutrófilos e eosinófilos para o tecido infectado, além de demonstrar a ausência de bactérias em outros tecidos até 24 h após o início da infecção experimental;
- A determinação da fração livre plasmática da piperacilina em ratos granulocitopênicos para a dose de 240 mg/kg foi igual a $0,69 \pm 0,18$ %. Este valor é maior do que o observado por DINIZ e colaboradores (2002) para animais igualmente granulocitopênicos ($0,53 \pm 0,11$ %) avaliados com outras doses;
- A taxa de recuperação das sondas de microdiálise *in vitro* para a piperacilina foi igual a $14,2 \pm 3,4$ %;
- A taxa de recuperação das sondas de microdiálise *in vivo* no tecido infectado foi igual a $13,5 \pm 3,7$ %, semelhante aos valores determinados por NOLTING e colaboradores (1996a) mostrando que o processo de infecção não altera a recuperação das sondas de microdiálise;

- Após a administração de PIP *i.v. bolus* na dose de 240 mg/kg determinou-se pela análise não-compartimental um $t_{1/2}$ de 40 ± 8 min; CL de $0,46 \pm 0,021$ (L/h/kg) e um V_{dss} de $0,30 \pm 0,06$ L/kg;
- Os perfis de concentração plasmáticas total após administração da dose de 240 mg/kg de piperacilina são adequadamente descritos pelo modelo aberto de dois compartimentos;
- Os resultados obtidos para a , b , α e β através da análise compartimental para a dose de 240 mg/kg foram de $1140,5 \pm 135,4$ $\mu\text{g/mL}$, $599,4 \pm 153,2$ $\mu\text{g/mL}$, $0,195 \pm 0,05$ min^{-1} e $0,022 \pm 0,003$ min^{-1} , respectivamente;
- A previsão das concentrações livres teciduais de piperacilina na dose de 240 mg/kg *i.v. bolus* baseada nos parâmetros farmacocinéticos plasmáticos superestimou os níveis teciduais medidos por microdiálise;
- O ajuste simultâneo das concentrações plasmáticas totais e livres teciduais, determinadas por microdiálise, após administração de piperacilina na dose de 240 mg/kg *i.v. bolus*, necessitou de um fator de proporcionalidade de $0,342 \pm 0,101$;
- Os resultados dos perfis de morte bacteriana em função do tempo para as doses de 120 e 240 mg/kg q4h, q6h e q8h corroboram a classificação da piperacilina como antibiótico com efeito bactericida tempo-dependente;
- O modelo PK-PD (E_{max} -modificado) descreveu de maneira adequada os perfis de crescimento e morte bacteriana em função do tempo obtidos nas diferentes posologias testadas *in vivo* (120 mg/kg e 240 mg/kg q4h, q6h, q8h) obtendo-se um EC_{50} de $1,31 \pm 0,27$ $\mu\text{g/mL}$ e um k_{max} $1,39 \pm 0,20$ h^{-1} .
- Os valores dos parâmetros da modelagem PK-PD obtidos *in vivo* diferiram dos descritos na literatura para o mesmo antibiótico e bactéria quando simulados *in vitro* (NOLTING *et al.*, 1996b).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, Bibiana Verlindo. **Avaliação do Modelo de Infecção Experimental em Coxa de Ratos Imunodeprimidos**. 1999. 49 p. Monografia (Conclusão do Curso de Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.
- ARAUJO, B.V; DALLA COSTA, T. Avaliação de Modelo de Infecção Experimental em Coxa de Ratos. *In: Salão de Iniciação Científica*, 11, 1999, Porto Alegre. *Livro de Resumos*, Porto Alegre: UFRGS/PROPESQ, 1999, p. 308.
- BEVENISTE, H. Brain microdialysis. **J. Neurochem.**, v. 52, n. 6, p. 1667-1679, 1989.
- BOXENBAUM, H. Interspecies scaling, allometry, physiological time, and the ground plan of pharmacokinetics. **J. Pharm. Bioph.**, v. 10, p. 201-227, 1982.
- CLEELAND R.; GRUMBERG, E. Laboratory evaluation of new antibiotics *in vitro* and in experimental animal infections, p. 825-867. *In: Lorian V. (Ed.), Antibiotics in laboratory medicine*. 2 ed. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1986.
- DALHOFF, A. e ULLMANN, U. Correlation between pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy of antibacterial agents in animal models. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 9, n. 7, p. 479-487, 1990.
- DALLA COSTA, T.; NOLTING, A.; KOVAR, A.; DERENDORF, H. Determination of free interstitial concentration of piperacillin-tazobactam combinations by microdialysis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 42, p. 769-778, 1998.
- DEF – Dicionário de Especialidades Farmacêuticas 99/00. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas, 2000.
- DEGUICHY, Y.; TERASAKI, T.; YAMADA, H.; TSUJI, A. An application of microdialysis to drug tissue distribution study - *In vivo* evidence for free-ligand hypothesis and tissue binding of β -lactams antibiotics in interstitial fluids. **J. Pharmacobiodyn.**, v. 15, p. 79-89, 1992.
- DE LA PENÃ, A.; DALLA COSTA, T.; TALTON, J.D.; REHAK, E. *et al.* Penetration of cefaclor into the interstitial space fluid of skeletal muscle and lung tissue in rats. **Pharm. Res.**, v. 18, n. 9, p. 1310-1314, 2001.
- DELACHER, S.; DERENDORF, H.; HOLLENSTEIN, U.; BRUNNER, M.; *et al.* A combined *in vivo* pharmacodynamic approach to simulate target site pharmacodynamics of antibiotics in human. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 46, n. 5, p. 733-739, 2002.

- DERENDORF, H. Pharmacokinetics evaluation of β -lactam antibiotics. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 24, p 407-413, 1989.
- DERENDORF, H.; HOCHHAUS, G. (Ed) **Pharmacokinetics Pharmacodynamics Correlation**. Boca Ranton: CRC Press, 1995.
- DERENDORF, H.; MEIBOHN, B. Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationship: concepts and perspectives. **Pharm. Res.**, v. 6, n. 2, p. 176-185, 1999.
- DEVER, L. A. e DEMORDY, T. S. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. **Arch. Intern. Med.**, v. 151, p. 886-895, 1991.
- DINIZ, A.; ARAUJO, B.V.; DALLA COSTA, T. Determination of free interstitial concentration of piperacillin by microdialysis on neutropenic *Escherichia coli* infected rat muscle. **Br. J. Med. Biol. Res.**, 2002. (*submetido*)
- DUDLEY, M.N.; GRIFFITH, D. Animal models of infection for the study of antibiotic pharmacodynamics. *In*: NIGHTINGALE, C.H. (Ed.). **Antimicrobial pharmacodynamics in theory and clinical practice**. New York: MacGraw Hill, 2002.
- ELMQUIST, W.F.; SAWCHUK, R.J. Application of microdialysis in pharmacokinetics studies. **Pharm. Res.**, v. 14, n. 3, p. 267-288, 1997.
- FORTNER, P.A.; CUMPS, J.; VERBEECK, R.K. Piperacillin sodium: antibacterial spectrum, pharmacokinetics, clinical efficacy and adverse reactions. **Pharmacoth.**, v. 2, n. 6, p. 287-299, 1982.
- FREDDO, Rodrigo José. **Avaliação das concentrações livres teciduais de norfloxacino através de microdiálise em músculo de ratos e correlação com as concentrações livres intersticiais**. 1998. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- GENNARO, A. (Ed.) **Remington: The science and practice of pharmacy**. 19.ed. Easton: Mack Publishing, 1995. v. 2.
- GIBALDI, M. e PERRIER, D. **Pharmacokinetics**. 2ª ed. New York: Marcel Dekker, 1989.
- GROTH, L. e JØRGENSEN, A. *In vitro* microdialysis of hydrophilic and lipophilic compounds. **Anal. Chim. Acta.**, v. 355, p. 75-83, 1997.
- Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation**. 2001. Disponível em <[http:// www.fda.gov](http://www.fda.gov)> Acesso em 08 mar. 2002.

- HARDMAN *et al.* (Ed.) **Goodman e Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- HOLFORD, N.H. G.; SHEINER, L.B. Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models. **Clin. Pharmacokinetic.**, v. 6, p. 429-453, 1981.
- HOLMES, B.; RICHARDS, D.M.; BROGDEN, R.N.; HELL R. C. Piperacillin – A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. **Drugs**, v. 28, p. 375-425, 1984.
- JOHANSSON, M.J.; NEWMAN, R.A.; MADDEN, T. The use of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Pharmacotherapy**, v. 17, n. 3, p. 464-481, 1997.
- JOUKHADAR, C.; FROSSARD, M.; MAYER, B.X.; BRUNNER, M.; *et al.* Impaired target site penetration of beta-lactams may account for therapeutic failure in patients with septic shock. **Crit. Care Med.**, v. 29, n. 2, p. 385-391, 2001.
- KONEMAN, E.W.; STEPHEN, D.A.; JANDA, W.M. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 5ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.
- LECHAT, P. *et al.* Determination of time-dependent effect profile of drugs **Therapie**, v. 52, n. 4, p. 291-298, 1997.
- LIMA, O.A.; SOARES, B.J.; GRECO, B.J. *et al.* **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica – Técnica e Interpretação**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.
- LÖNNROTH, P.; JANSSON, P.A.; SMITH, U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in human. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. 228-231, 1987.
- MATTIE, H. Kinetics of antimicrobial action. **Rev. Infect. Dis.**, v. 3, p. 19-27, 1981.
- MENACHERY, S.; HUBERT, W.; JUSTICE, J. B. Jr. *In vivo* calibration of microdialysis probes for exogenous compounds. **Anal. Chem.**, v. 64, p. 577-583, 1992.
- MORRISON, J.A. e BATRA, V.K. Pharmacokinetics of piperacillin sodium in man. **Drug Expt. Clin. Res.**, v. 5, n. 23, p. 105-110, 1979.
- NIGHTINGALE, C.H.; QUINTILIANI, R.; NICOLAU, D.P. Intelligent dosing of antimicrobials. **Cur. Clin. T. Infect. Dis.**, v. 14, p. 252, 1994.
- NISHINO, T.; ZAK, O. Systemic infection in mice: a first-line screening model in

- the evaluation of new antibiotics, p. 72-74. *In*: Ishigami, J. (Ed), **Recent Advances in Chemotherapy**. Tokio: University of Tokio Press, 1985.
- NOLTING, A.; DALLA COSTA, T.; RAND, K.H.; DERENDORF, H. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic modeling of the antibiotic effect of piperacillin *in vitro*. **Pharm. Res.**, v. 13, n.1, p. 91-96, 1996a.
- NOLTING, A.; DALLA COSTA, T.; VISTELLE, R.; DERENDORF, H. Determination of free extracellular concentration of piperacillin by microdialysis. **J. Pharm. Sci.**, v. 85, n. 4, p. 369-372, 1996b.
- REYNOLDS, J.E.F. (Ed.) **Martindale the Extra Pharmacopoeia**. 30^a ed. London: Pharmaceutical Press, 1993.
- SCIENTIST** User Handbook. MicroMath: Salt Lake City, p. 467-468. 1995.
- SMITH, H. What happens to bacterial pathogens *in vivo*? **Trends Microb.**, v. 6, n. 6, p. 239-243, 1998.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1996.
- VOGELMAN, B.; GUDMUNDSSON, S.; LEGGET, J.; *et al.* *In vivo* postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice. **J. Infect. Dis.**, v. 146, n. 3, p. 423-428, 1988.
- ZAK, O. Scope and limitations of experimental chemotherapy. **Experientia**, v. 36, p. 479-483, 1980.
- ZAK, O.; O'REILLY, T. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 35, n. 8, p. 1527-1531, 1991.
- ZARZUELO, A.; LÓPEZ, F.G.; SANTOS, M.; LANA O, J.M. Determination of piperacillin in biological samples by HPLC. **J. Liq. Chrom. Rel. Technol.**, v. 19, n. 4, p. 601-610, 1996.

BIOGRAFIA

Bibiana Verlindo de Araújo, nascida em 18 de julho de 1976, filha de Felisberto J.B. de Araújo e Maria das Graças Verlindo de Araújo. Ingressou na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 1995, graduando-se em 1999. Durante este período desenvolveu atividades inicialmente ligadas a área de otimização de novas metodologias para o setor industrial, como bolsista da PROPESQ. No ano seguinte atuou como monitora das disciplinas de Química Geral Inorgânica I e II. Em 1997 iniciou-se no ramo da microbiologia como estagiária no Laboratório de Fungos Filamentosos do Centro de Biotecnologia da UFRGS, no projeto “Purificação de Quitinases de *Metarhizium anisoplae*”, mais adiante, em 1998, deu início ao seu trabalho no projeto “Avaliação Farmacocinética-Farmacodinâmica de Piperacilina em Ratos Imunodeprimidos e Infectados com *Escherichia coli*” como bolsista do CNPq. Ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, nível mestrado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da profa. Dra. Teresa Dalla Costa em março de 2000. Graduou-se mestre em Ciências Farmacêuticas em maio de 2002.

Produção Científica:

Trabalhos Apresentados em Congresso

GALLAS, M.R.; DINIZ, A.; ARAUJO, B.V.; DALLA COSTA, T. Determinação das Concentrações Livres Intersticiais de Piperacilina em Ratos Infectados com *Escherichia Coli*. *In: Salão de Iniciação Científica*, 10, 1998, Porto Alegre. *Livro de Resumos*, Porto Alegre: UFRGS/PROPESQ, 1998, p.297.

ARAUJO, B.V.; GALLAS, M.R.; DINIZ, A.; DALLA COSTA, T. Adaptação de Metodologia para Doseamento de Piperacilina em Plasma e dialisado de Tecido através de CLAE. *In: Salão de Iniciação Científica*, 10, 1998, Porto Alegre. *Livro de Resumos*, Porto Alegre: UFRGS/PROPESQ, 1998, p.297.

DINIZ, A.; GALLAS, M.R.; ARAUJO, B.V.; DALLA COSTA, T. Determinação das Concentrações Livres Intersticiais de Piperacilina por Microdiálise em Ratos Infectados. *In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE*, 14, 1999, Caxambú- MG. *Livro de Resumos*, São Paulo: FeSBE, 1999, p.214.

ARAUJO, B.V; DALLA COSTA, T. Adaptação de Modelo de Infecção Experimental em Coxa de Ratos. *In: Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)*, 19, 1999, Porto Alegre. *CD room de Resumos*, Porto Alegre: UFRGS/HCPA, 1999.

ARAUJO, B.V; DALLA COSTA, T. Avaliação de Modelo de Infecção Experimental em Coxa de Ratos. *In: Salão de Iniciação Científica*, 11, 1999, Porto Alegre. *Livro de Resumos*, Porto Alegre: UFRGS/PROPESQ, 1999, p. 308.

ARAUJO, B.V.; DALLA COSTA, T. *In Vivo* Evaluation of E-max Modified Model for Piperacillin. *In: Latinamerican Congress of Pharmacology*, 16, 2000, Águas de Lindóia-SP. Abstracts, São Paulo: ALF, 2000, p.280.

HEINEN, J. E.; BUFFÉ, C.; ARAUJO, B.V; DALLA COSTA, T.; EDELWEIS, M.I. Determinação da Taxa de Recuperação de Sondas de Microdiálise para Piperacilina em Tecido Infectado. *In: Salão de Iniciação Científica*, 12, 2001, Porto Alegre-RS. Livro de Resumos, Porto Alegre: UFRGS/PROPESQ, 2000, p.374.

HEINEN, J.E.; BUFFÉ,C.; ARAUJO,B.V; DALLA COSTA, T.; EDELWEIS,M.I. Microdiálise em Tecido Infectado: Determinação das Taxas de Recuperação. *In: Semana Científica do HCPA*, 20, 2001, Porto Alegre-RS. CD room de Resumos, Porto Alegre: UFRGS/HCPA, 2000.

ARAUJO,B.V; BUFFÉ,C.; HEINEN, J.E.; DALLA COSTA, T.; Evaluation of a PK-PD Model to Describe the Antibacterial Effect of Piperacillin in Infected Rats. *In: Congresso de Ciências Farmacéuticas de Las Américas*, 1, 2001, Orlando-FL,USA, Abstracts, Orlando:AAPS, 2001, p. 169.

ARAUJO, B.V.; GUARANHA, C.; PALMA, E.C.; DALLA COSTA, T. Modeling PK-PD to β -lactam antibiotics. *In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE*, 16, 2001, Caxambú- MG. *Livro de Resumos*, São Paulo: FeSBE, 2001, p. 227.

Artigos Publicados

Buffé, C., Araujo, B.V., Dalla Costa, T. Parâmetros Farmacocinéticos e Farmacodinâmicos utilizados na otimização de terapias antimicrobianas, **Caderno de Farmácia- UFRGS**, v. 17, n.2 , 2001.