



PENETRAÇÃO TECIDUAL DE ANTIBIÓTICOS

Juliana E. HEINEN¹; Rodrigo J. FREDDO²; Teresa DALLA COSTA^{1 2}

¹Departamento de Produção e Controle de Medicamentos, ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia – UFRGS

RESUMO: Objetivando eliminar ou inibir o agente patogênico, os antimicrobianos devem alcançar concentrações efetivas no local da infecção. A penetração tecidual destes agentes pode ser influenciada por vários fatores, relacionados com o fármaco ou com o local da infecção. Com relação ao fármaco, podem interferir na penetração suas características químicas, a via de administração, o coeficiente de difusão e a ligação a proteínas. Quanto ao local da infecção, fatores como a inflamação, circulação sanguínea, pH local e a geometria do compartimento são importantes. Visando avaliar a penetração tecidual dos antibióticos, vários modelos experimentais têm sido empregados, tais como homogenado de tecido, indução de bolha cutânea, implantação de câmaras teciduais e, mais recentemente, microdiálise. Este trabalho objetiva revisar os modelos experimentais *in vivo* mais empregados em estudos da penetração tecidual de antimicrobianos e os fatores que influenciam esta penetração.

UNITERMOS: Penetração tecidual, antibióticos

ABSTRACT: *TISSUE PENETRATION OF ANTIBIOTICS.* To inhibit or even eliminate the pathological agent, the antimicrobial drug must reach effective concentrations at the site of action. This penetration can be influenced by many factors, which either can be related to the drug or to the site of action. Regarding the drug, its physical-chemical properties, the administration route, the diffusion coefficient, and the protein binding are parameters that can interfere on its penetration. Regarding the site of action, the inflammation process, the local blood circulation, the pH, and the compartmental geometry are reported to affect antibiotics tissue penetration. Several models have been used to evaluate drug tissue concentrations in animals and humans such as tissue homogenate, skin blister fluid, tissue cages and, more recently, microdialysis. This review presents the most common *in vivo* experimental models used to investigate antimicrobial tissue penetration and the factors that can influence this process.

KEYWORDS: Tissue Penetration, Antibiotics

INTRODUÇÃO

Para ser eficaz contra um microrganismo causador de um processo infeccioso, o antimicrobiano deve alcançar concentrações suficientes no local de infecção para eliminar ou inibir o agente patogênico (TAVARES, 1996). Para alcançar tais concentrações no local de infecção, o antimicrobiano deve estar na sua forma livre, ou seja, não ligada a proteínas, pois somente essa fração livre do fármaco está disponível para atravessar as paredes dos vasos capilares, interagir com o agente patogênico e exercer o efeito terapêutico (DINIZ, 2000).

A penetração de fármacos em tecidos infectados quase sempre ocorre por processo de difusão passiva e, por isso, a taxa de penetração é proporcional à concentração de fármaco livre no plasma ou no líquido extracelular. Assim, os fármacos que se ligam extensamente a proteínas podem não penetrar nos tecidos infectados com a mesma amplitude e eficiência que os fármacos

com menor grau de ligação (CHAMBERS e SANDE, 1996).

Além da ligação a proteínas plasmáticas (WISE, 1983; BERGERON, 1986; DUDLEY e col., 1990; WODNUTT e col., 1995; SHYU, 1998), diversos fatores podem influenciar a distribuição tecidual e a eficácia dos agentes antimicrobianos. Estes fatores podem tanto estar relacionados ao tecido infectado, devido à presença de enzimas bacterianas, à circulação sanguínea local modificada, ao pH ácido ou alcalino e ao ambiente anaeróbico (BERGERON, 1986), quanto estar relacionados ao fármaco e às suas características físico-químicas. Entre os fatores relacionados ao fármaco pode-se citar o coeficiente de difusão (MEULEMANS, 1989), a lipossolubilidade, que é influenciada pelo pH tecidual (BERGERON, 1986; WISE e col., 1986), o transporte ativo do fármaco, responsável, muitas vezes, pelo efluxo do tecido (WISE, 1983) e a via de administração (BERGERON, 1986; LIMBERG e col., 1990).

A penetração tecidual de antibióticos e os fatores determinantes da mesma têm sido estudados em vários modelos *in vitro* e *in vivo*, tanto em animais como em humanos (WISE, 1983). Os resultados obtidos nos modelos *in vitro* são dificilmente extrapoláveis para os seres humanos, uma vez que, avaliam os fatores isoladamente, sem considerar a complexidade da situação *in vivo*. Os modelos *in vivo*, utilizados para amostrar a concentração tecidual de antimicrobianos, podem ser separados em modelos clássicos e microdiálise. Os métodos clássicos envolvem homogenados de tecidos e coleta de fluidos fisiológicos ou patológicos, ou induzidos experimentalmente, através de variadas técnicas (BERGAN, 1981; WISE e col., 1986). Através dessas técnicas são determinadas as concentrações teciduais totais dos antimicrobianos, apesar de saber-se que apenas a fração livre é responsável pela ação bactericida ou bacteriostática. O método que, atualmente, está sendo empregado para superar este obstáculo, uma vez que permite coletar apenas a fração livre intersticial dos fármacos em uma determinada biofase, é a microdiálise. Este possui a vantagem de permitir a análise do fármaco no líquido intersticial em situações praticamente fisiológicas, uma vez que, as alterações causadas pela sonda de microdiálise inserida no tecido são mínimas, e seu comportamento assemelha-se ao comportamento de um vaso sanguíneo.

Em vista do exposto, este trabalho objetiva revisar os fatores que afetam a penetração de antibióticos nos tecidos e as técnicas *in vivo* utilizadas experimentalmente para determinar esta penetração.

TÉCNICAS DE AMOSTRAGEM TECIDUAL

Os modelos clássicos utilizados para a avaliação farmacocinética tecidual de antimicrobianos, em animais e humanos, de um modo geral, só permitem a determinação das concentrações totais do fármaco no tecido ou órgão que se deseja investigar.

Os métodos clássicos envolvem homogenados de tecidos, coleta de fluidos fisiológicos ou patológicos e fluidos induzidos experimentalmente através da formação de bolhas por sucção ou indução química, ou implante de fios de algodão, câmaras teciduais ou coágulos de fibrina, que podem ser coletados por punção ou retirada do material causador da infecção (BERGAN, 1981; WISE e col., 1986; SHYU, 1998; LIMBERG e col., 1990; NIX e col., 1991b).

Considerando que, somente as concentrações livres teciduais estão em equilíbrio com as concentrações plasmáticas livres e que, somente as concentrações livres no local de ação exercem o efeito antimicrobiano desejado, os métodos experimentais que permitem avaliar essas concentrações livres seriam os mais

adequados. No entanto, não eram utilizados com este objetivo até recentemente. Atualmente, a técnica de microdiálise tem se mostrado eficaz para esta avaliação (ELMQUIST e SAWCHUK, 1997).

Homogenado de tecido: Este método consiste na biópsia de uma pequena amostra do tecido sob investigação do animal em experimentação, previamente tratado com o fármaco. O material de biópsia é recolhido sobre um papel absorvente, para retirar o excesso de sangue na superfície. Esta amostra sofre um processo de homogeneização, com auxílio de volume conhecido de solução fisiológica, em que há o rompimento das membranas celulares, produzindo uma suspensão que contém os fluidos intra e extracelulares, além de sangue. Em seguida, é feita uma centrifugação da suspensão e o sobrenadante é recolhido para posterior análise das concentrações de antimicrobiano, com técnica analítica específica (NIX e col., 1991a).

Este método determina as concentrações teciduais totais do fármaco, intra e extracelular, sem permitir a distinção entre estas duas frações, o que se torna sua principal desvantagem. Outra desvantagem deste método é que possibilita apenas uma coleta de amostra por animal experimental, não sendo adequado para traçar o perfil de concentração por tempo do fármaco e permitir uma avaliação farmacocinética adequada (NIX e col., 1991a).

Além das desvantagens citadas, outros fatores podem influenciar os níveis de fármaco encontrados nos homogenados de tecidos. Estes incluem a presença de enzimas que inativam o antibiótico (BERGAN, 1981), a degradação do antibiótico durante o processo de homogeneização (NIX e col., 1991a) e a presença de sangue na amostra (WISE, 1983; NIX e col., 1991a). Estes fatores vão resultar em alteração das concentrações reais, dificultando a avaliação da penetração do antibiótico no tecido investigado.

A utilização desta técnica foi também relatada para humanos. WISE, em 1983, revisou trabalhos da literatura que avaliavam a penetração tecidual de antibióticos β -lactâmicos em humanos, utilizando a técnica de homogenado de tecido. O autor constatou que a mesma tem sido utilizada para determinar as concentrações destes antibióticos nos ossos, rins, fígado e em outros tecidos. Contudo, homogenados de fígado e rins possuem grandes quantidades de sangue e fluidos intra e extracelulares, além de bile e urina, sendo que muitos antibióticos concentram-se em ambos os fluidos, elevando significativamente as concentrações totais resultantes nestes tecidos. Deste modo, não é de se estranhar que existam relatos de altas concentrações e, conseqüentemente, grande penetração de

antibióticos β -lactâmicos em tecido hepático e renal (WISE, 1983).

A avaliação da penetração de antibiótico utilizando homogenado de tecidos assume que o fármaco possui uma distribuição uniforme por todo o tecido biopsiado. Entretanto, o fármaco pode distribuir-se desigualmente entre o fluido vascular, fluido intra e extracelular e as organelas celulares. Desse modo, alguns fármacos como os antibióticos β -lactâmicos e os aminoglicosídeos, que não atravessam a membrana celular, concentrando-se no fluido extracelular, vão apresentar concentrações totais relativamente menores, em função da “diluição” ocasionada pelo líquido intracelular. Por outro lado, os macrolídeos e as fluorquinolonas, que atravessam a membrana das células, apresentarão uma penetração celular relativamente maior, devido às altas concentrações do fármaco obtidas nos homogenados de tecidos (NIX, 1998; NIX e col., 1991b). Portanto, a medida de concentração total de fármacos em homogenados de tecido não leva em consideração a distribuição desigual destes e pode confundir as previsões das concentrações efetivas no local da infecção.

Um método alternativo, que parece evitar alguns dos problemas inerentes ao uso de homogenados de tecidos, é a extração do fluido tecidual através da aplicação de uma forte sucção (vácuo inferior a 100 atmosferas) nas peças de biópsia. Utilizando um aumento do vácuo, o fluido intracelular também pode ser obtido deste tecido. Este método já foi empregado para estudos com estreptomicina e tetraciclina mostrando que estas ficam limitadas ao espaço extracelular de fígado e pulmão (BERGAN, 1981).

Fluidos fisiológicos ou patológicos: Outros métodos clássicos de amostragem tecidual relacionam-se a coleta de fluidos fisiológicos, como linfa, líquido sinovial, líquido pleural ou a coleta de fluidos patológicos, como o líquido de ascite.

Linfa: A linfa é utilizada para medir os níveis de antimicrobianos, porque representa um fluido de drenagem do espaço intercelular de diferenciados tecidos do organismo. Em contraste com outros modelos, a coleta de linfa tem a vantagem de permitir o monitoramento da penetração do fármaco por um período prolongado de tempo, uma vez que várias amostras podem ser coletadas no mesmo indivíduo. A linfa possui baixo conteúdo protéico, equivalente a 25 % do conteúdo protéico plasmático. As concentrações totais medidas na linfa podem ser consideradas como representativas daquelas presentes no fluido intersticial (BARZA, 1981).

Para amostragem deste fluido biológico procede-se a canulação dos vasos linfáticos. Normalmente, amostras da linfa periférica são

mais utilizadas por refletirem melhor as condições observadas nos tecidos do que a linfa central, retirada do ducto torácico (BERGAN, 1981).

Há poucos estudos a respeito da penetração de antibióticos na linfa humana (BERGAN, 1981), sendo que a maioria dos estudos foi realizada em animais, como o cão, por exemplo (BARZA, 1981).

Outros fluidos biológicos

Além da linfa, outros fluidos biológicos tem sido utilizados para determinação da penetração tecidual de antimicrobianos. Entre estes pode-se citar o *fluido sinovial*, que apresenta baixo conteúdo protéico; o *fluido peritoneal*, com alto conteúdo protéico o *fluido pleural*, cujo conteúdo protéico depende da extensão da inflamação, e o *líquido cefalo-raquidiano*. Uma vez que estes sítios não obedecem a lei de difusão passiva, tendo o processo de distribuição ocorrendo também por transporte ativo, não podem ser usados para prever as concentrações dos antibióticos levando em consideração apenas este processo (NIX e col., 1991a). No caso do *líquido cefalo-raquidiano*, sabe-se que o processo de transporte ativo está relacionado com o efluxo de fármacos, como no caso dos β -lactâmicos, por exemplo, determinando uma menor penetração dos mesmos (WISE, 1983).

A utilização de alguns destes fluidos para determinação da concentração de antibióticos é dependente da presença ou não de processo inflamatório. Foi relatado na literatura que a concentração de antibióticos β -lactâmicos no líquido sinovial sem inflamação é igual à concentração livre no sangue. No entanto, quando se instala um processo inflamatório nas articulações, a concentração destes antibióticos aumenta no líquido sinovial, sendo aproximadamente igual à concentração sérica total (WISE, 1983).

Líquido de ascite: O ascite é um transudato proveniente do acúmulo de líquido na cavidade peritoneal, que contém proteínas. Em função de ser produzido em decorrência de um processo patológico e de possuir um grande volume, serve como reservatório do fármaco. Desse modo, as concentrações obtidas neste líquido não refletem as concentrações presentes no líquido extracelular dos tecidos (WISE, 1983).

Fluidos induzidos experimentalmente:

Formação de bolha cutânea (Skin blister): Os modelos de formação de bolha induzida na pele por sucção são, talvez, os mais usados para estimar as concentrações dos antibióticos no fluido extracelular. Este modelo pode ser empregado em humanos e animais. No ser humano, as bolhas são produzidas no antebraço, enquanto que nos animais são produzidas no dorso (NIX e col., 1991b).

Estas bolhas não-inflamadas podem ser induzidas pela aplicação de um bloco perfurado na superfície do antebraço ou dorso, onde vácuo é aplicado por aproximadamente duas horas. Este processo forma bolhas na pele que contém um volume de 0,1 a 0,2 mL de fluido e um conteúdo protéico inferior ao do plasma (NIX e col., 1991b).

O método mais utilizado de indução de bolhas inflamadas e exsudativas utiliza agentes químicos para produzir a reação inflamatória. As bolhas são induzidas utilizando um molde de gesso contendo uma pomada de cantaridina a 0,2 %, que é colocado sobre a superfície do antebraço. Assim, muitas bolhas são formadas através de uma resposta inflamatória. O fluido presente nestas bolhas apresenta uma quantidade maior de proteínas que aquela presente no fluido extravascular, fazendo com que a concentração do antibiótico pareça mais alta do que a concentração real presente no líquido intersticial (BERGAN, 1981; WISE e col., 1986; NIX e col., 1991a).

Apesar de ser vantajosa em relação ao homogenizado de tecido, uma vez que não determina a concentração intracelular juntamente com a extracelular, a concentração do fármaco encontrada nestes líquidos corresponde às concentrações totais extracelulares (SCHÄFER-KORTING, 1995). Logo, dois problemas estão relacionados a estes métodos. O primeiro é a necessidade de um número muito grande de animais para avaliar a distribuição do fármaco nos tecidos em função do tempo. O segundo é a determinação da concentração total extracelular, que não corresponde à concentração ativa.

Implante de fios de algodão (Cotton threads): Outra técnica utilizada para medir a difusão de antibióticos para o fluido extracelular envolve o implante de fios de algodão em tecidos subcutâneos (WISE e col., 1986; NIX e col., 1991b). Os fios de algodão são estéreis e uniformes em comprimento e peso e são removidos e pesados em tempos diversos, após a administração do fármaco. A concentração do antibiótico é medida por métodos microbiológicos e, por isso, os resultados não são muito precisos, uma vez que, além do fármaco poder aderir-se às fibras do algodão, estas podem ser atacadas por proteínas teciduais (NIX e col., 1991b). Poucos trabalhos na literatura utilizam esta técnica, sendo considerada de menor importância.

Implante de câmaras teciduais (Tissue Chambers ou Cages): Neste método experimental, câmaras permeáveis de metal ou teflon são cirurgicamente implantadas nos tecidos subcutâneo ou peritoneal de animais. Estas câmaras são utilizadas para coletar o fluido produzido no local da implantação, após um período pré-determinado (BERGAN, 1981; NIX e col., 1991b). O processo de implantação causa

uma resposta inflamatória que pode durar até três semanas. Após quatro semanas, o fluido contido no reservatório é bioquimicamente similar ao fluido extravascular (NIX e col., 1991b).

Este tipo de reservatório tem a vantagem de possibilitar a coleta de diversas amostras no mesmo animal experimental por um período de várias semanas, uma vez que a coleta do líquido produzido é feita por punção da câmara (BERGAN, 1981). A punção deve ser feita com cuidado para impedir a contaminação da câmara, que alteraria os resultados obtidos (NIX e col., 1991b.)

Este método apresenta algumas limitações que podem prejudicar o recolhimento do fluido contido na câmara, como a variação da concentração de proteínas no local da implantação e o desenvolvimento de tecido fibroso e vascular em função do tempo de implantação (NIX e col., 1991b).

Como a câmara geralmente é esférica, outra limitação do método é a pequena relação entre a área superficial e o grande volume de fluido contido na câmara. Como resultado, o pico de concentração do antibiótico na câmara ocorre em um tempo defasado em relação ao pico plasmático, mesmo que as concentrações teciduais entrem em equilíbrio com o sangue de modo mais rápido (NIX e col., 1991b).

Implante de coágulo de fibrina (Fibrin clots): Modelo paralelo ao de *cage*, em que há o implante de coágulos pré-formados de fibrina no tecidos subcutâneos de animais, através de cirurgia. Estes coágulos têm a vantagem de ser produzidos com substância normalmente presente no processo inflamatório. O fármaco administrado penetrará nos coágulos por difusão passiva e estes serão removidos em tempos pré-determinados para doseamento dos mesmos. Como desvantagens do método, têm-se que a própria cirurgia, que envolve a implantação dos coágulos, causa uma resposta inflamatória e o fato de que a fibrina, por ser um componente natural de tecidos infectados ou cavidades corporais, age como barreira à difusão do fármaco, podendo falsear os resultados de concentração obtidos (BERGAN, 1981).

Tanto as câmaras quanto os coágulos podem ser previamente infectados com um microrganismo específico visando avaliar o efeito farmacodinâmico dos antibióticos investigados ou as concentrações reais no local da infecção.

Outras técnicas de amostragem clássica incluem a utilização de abrasão da pele (*skin abrasion*) e coleta do transudato produzido através da utilização de disco de papel absorvente (*paper disks*) e a coleta de fluidos produzidos em ferimentos (BERGAN, 1981; NIX e col., 1991b). Estas técnicas, no entanto, são menos freqüentemente relatadas na literatura.

Microdiálise: Atualmente, a técnica mais utilizada para determinar as concentrações teciduais livres de fármacos no espaço intersticial é a microdiálise (MD). A MD é uma ferramenta importante para estudos de farmacocinética, pois permite um melhor monitoramento do conteúdo do fluido extracelular caracterizando, portanto, o fármaco no local de ação e a disposição da fração livre do mesmo em vários tecidos e órgãos, em função do tempo. Levando-se em conta os inúmeros fatores que influenciam a penetração do fármaco nos tecidos e órgãos, o monitoramento de suas concentrações livres nos locais de ação permite um estudo farmacocinético mais detalhado, se comparado com dados obtidos indiretamente através da análise do plasma (JOHANSEN e col., 1997).

Esta técnica utiliza o princípio da diálise e consiste de uma sonda que possui em sua extremidade uma membrana permeável a água e a pequenos solutos, que é continuamente irrigada com o líquido de perfusão. Para a execução da técnica, implanta-se a sonda de microdiálise no tecido ou órgão de interesse para a coleta das amostras, com auxílio de uma cânula guia. A sonda de MD é formada pelo conjunto da membrana semi-permeável com os tubos conectores de entrada e saída (fig. 1). A sonda permanece ligada a uma seringa, através do tubo conector de entrada, que a irriga com o líquido de perfusão isento do fármaco de interesse, num fluxo constante, controlado por uma bomba. O líquido de saída ou dialisado é coletado continuamente através do tubo conector de saída. Após a administração do fármaco de interesse ao indivíduo, um gradiente de concentração é criado, causando difusão da substância de interesse do espaço intersticial para dentro da membrana. O fluxo contínuo do líquido de perfusão através da membrana carrega a substância dialisada para

fora do sistema, podendo ser coletada para análise.

Uma das vantagens da técnica de MD é que as amostras coletadas são praticamente puras. Considerando que essa técnica é realizada *in vivo*, o fato das membranas escolhidas serem semi-permeáveis e possuírem a menor porosidade possível, permite a passagem da substância em estudo e impossibilita a passagem de outras de grande peso molecular, como proteínas, por exemplo (JOHANSEN e col., 1997).

Outra vantagem inerente à técnica de MD é a pequena lesão tecidual causada (BENVENISTE e HÜTTEMEIER, 1990) em comparação às técnicas clássicas de amostragem tecidual citadas anteriormente. Assim sendo, nas amostras de MD têm-se as representações, de modo mais real, das concentrações das substâncias endógenas e/ou exógenas no tecido em estudo, em condições fisiológicas.

Além da pureza das amostras e a mínima lesão tecidual que causa, a MD possibilita o monitoramento simultâneo da distribuição do fármaco, em um mesmo animal, em mais de um tecido ou órgão. A MD também permite avaliação concomitante de mais do que uma substância de interesse, no mesmo local ou em diferentes locais do organismo do animal experimental (JOHANSEN e col., 1997), podendo ser utilizada para avaliar a associação de antibióticos e a influência de um sobre a farmacocinética do outro. A MD permite, ainda, o acompanhamento das variações de concentração da substância de interesse em função do tempo, no mesmo animal experimental, reduzindo o número de animais necessários para os estudos farmacocinéticos e aumentando a precisão dos resultados obtidos.

A técnica de MD apresenta algumas

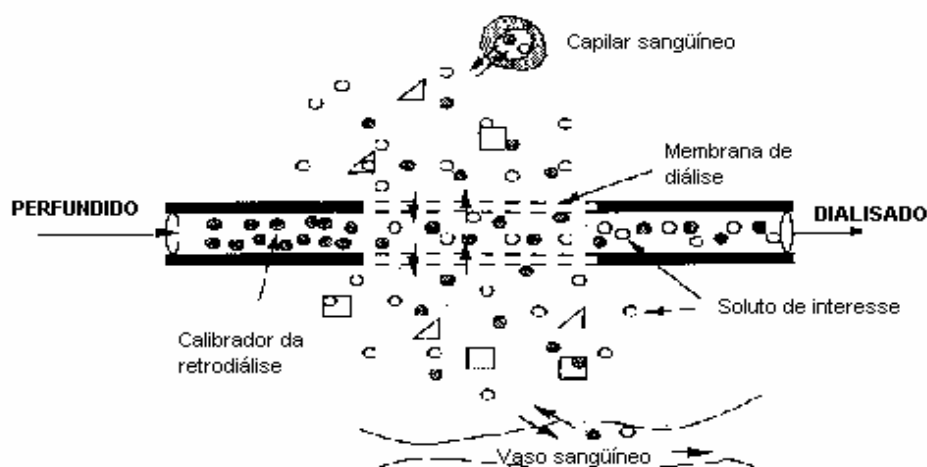


Figura 1. Sonda de microdiálise indicando o fluxo de entrada e saída do líquido de perfusão e a movimentação da substância em estudo (Adaptado de ELMQUIST e SAWCHUK, 1997).

desvantagens, tais como o pequeno volume coletado em cada amostra, o que pode dificultar algumas determinações analíticas; a necessidade de realizar testes de recuperação da membrana *in vivo*, fundamental para assegurar a precisão dos resultados quando se realizam análises quantitativas; o tempo de resolução maior que cinco minutos, significando que eventos que iniciem e finalizem em menor espaço de tempo não podem ser amostrados; o efeito de drenagem, ou seja, uma diminuição gradativa das concentrações da substância de interesse nas proximidades da membrana, devido à drenagem pela sonda e ao alto custo dos equipamentos e sondas necessárias para sua realização (BENVENISTE, 1989).

Vários trabalhos são relatados na literatura comparando o perfil plasmático total de antibióticos β -lactâmicos com as concentrações livres teciduais, obtidas por microdiálise, comprovando a adequabilidade desta técnica de amostragem para determinação das concentrações intercelulares farmacologicamente ativas destes fármacos, permitindo assim, um melhor dimensionamento da penetração tecidual dos mesmos (NOLTING e col., 1996; KOVAR e col., 1997; DALLA COSTA e col., 1998).

A partir do conhecimento das técnicas mais utilizadas para amostrar os antibióticos nos tecidos, pode-se avaliar os fatores que afetam a sua penetração tecidual.

FATORES QUE AFETAM A PENETRAÇÃO

Fatores relacionados ao fármaco

A absorção, distribuição, biotransformação e excreção de um fármaco são feitas através de membranas celulares. Portanto, é essencial observar os mecanismos pelos quais o fármaco atravessa a membrana e as propriedades físico-químicas das moléculas e da membrana que influenciam essa transferência. O tamanho e o formato da molécula, a solubilidade no local de absorção, o grau de ionização, a lipossolubilidade relativa das formas ionizadas e não-ionizadas, a ligação a proteínas, o coeficiente de difusão e o modo de administração são características importantes do fármaco que afetam sua penetração nos diferentes órgãos e tecidos do organismo (BENET e col., 1996).

Via de administração: A via de administração dos antibióticos, juntamente com suas propriedades físico-químicas, definem a velocidade de penetração tissular dos mesmos. A via de administração pode ainda influenciar a biodisponibilidade do antibiótico administrado, uma vez que este pode sofrer processos de degradação ou inativação durante a absorção, reduzindo as quantidades disponíveis na biofase.

WISE e col. (1986) compararam a penetração tecidual de quatro quinolonas,

administradas de dois modos diferentes em voluntários sadios. As quinolonas utilizadas foram norfloxacin (400 mg po), enoxacin (600 mg po e 400 mg iv), ciprofloxacino (199 mg iv e 500 mg po) e ofloxacino (600 mg po). Após a administração dos fármacos aos voluntários, as concentrações dos antibióticos foram medidas no sangue e no fluido de bolha cutânea induzida por cantaridina. Eles encontraram que o efloxacin e o enoxacin orais penetraram no fluido de bolha cutânea mais lentamente que o norfloxacin e o ciprofloxacino, e que estes, comparados com enoxacin e ciprofloxacino intravenoso, tiveram uma penetração mais lenta. Concluindo-se então, que, após a administração intravenosa, os níveis destes antibióticos são alcançados mais rapidamente.

Características físico-químicas do fármaco: A alta solubilidade lipídica e a alta solubilidade em água são fatores importantes na penetração de antibióticos nos tecidos e na passagem deles para dentro das células, quando isso ocorre (BERGAN, 1981).

Fármacos como o cloranfenicol e a rifampicina, os quais são altamente solúveis em lipídios, penetram prontamente nos tecidos e no sistema nervoso central. Por outro lado, fármacos solúveis em água, incluindo penicilinas e cefalosporinas, são de difícil penetração no fluido cerebroespinal. A penicilina G, por exemplo, é encontrada em baixas concentrações no fluido cerebroespinal, entretanto, tais concentrações são suficientes para inibir *N. meningitidis* ou *S. pneumoniae* (BERGERON, 1986). As baixas concentrações observadas para os β -lactâmicos no líquido cerebroespinal também estão relacionadas ao mecanismo de efluxo por transporte ativo, observado para estes fármacos (WISE, 1983).

A hidrossolubilidade/lipossolubilidade depende de dois fenômenos: do grau de dissociação do fármaco (pKa) e do coeficiente de partição. Sabe-se também, que apenas a forma não ionizada do fármaco é capaz de penetrar nos tecidos, uma vez que é mais lipossolúvel. A maioria dos antibióticos é constituída por ácidos ou bases orgânicas de baixa massa molecular. Dependendo do pKa do antibiótico e do pH do sangue, obtém-se maior ou menor penetração tecidual. Os antibióticos β -lactâmicos, por exemplo, geralmente são ácidos fracos e no pH do soro (pH 7,4) terão uma relação da forma ionizada/não-ionizada de aproximadamente 1:10.000, apresentando, portanto, alta penetração no líquido intersticial (WISE e col., 1986).

A avaliação das características de solubilidade dos antibióticos pode ser de grande importância na escolha da terapia adequada para

o tratamento de determinadas infecções, tipo infecções do trato urinário.

Coefficiente de difusão: Os antibióticos, geralmente, penetram nos tecidos por difusão passiva, seguindo um gradiente de concentração de acordo com sua solubilidade na camada lipídica. Essa transferência é diretamente proporcional à magnitude do gradiente de concentração através da membrana e do coeficiente de partição óleo/água do fármaco. Quanto maior o coeficiente de partição, maior a concentração do fármaco na membrana e mais rápido o processo de difusão (BENET e col., 1996).

Há poucas informações na literatura a respeito dos valores dos coeficientes de difusão de antibióticos. O coeficiente de difusão, em geral, é usado para previsões de gradiente de concentração entre capilares ou concentrações em áreas não-vascularizadas (MEULEMANS e col., 1989).

MEULEMANS e col. (1989) descreveram um novo método para determinar o coeficiente de difusão, o qual foi utilizado para avaliar antibióticos no córtex frontal de ratos. Este método foi baseado na determinação do gradiente de concentração do antibiótico utilizando voltimetria com microeletrodos. Este método mediu a difusibilidade da fração livre dos antibióticos no cérebro. Quatro antibióticos foram avaliados: metronidazol, cloranfenicol, cefsulodina e piperacilina. Os autores observaram que havia uma diferença significativa entre os valores dos coeficientes de difusão para estes fármacos, dependendo da carga dos mesmos. A explicação para os resultados foi baseada na verificação de que o tecido cerebral é negativamente carregado e, em estudo com catecolaminas, observou-se que a difusão em tecido cerebral é mais lenta quando as moléculas estão positivamente carregadas. Desse modo, o cloranfenicol, carregado positivamente, apresentou um coeficiente de difusão inferior aos demais antibióticos testados. Os autores concluíram que esses valores de coeficiente de difusão determinados pelo método podem ser usados para outros tecidos e servem para prever valores de difusão destes fármacos em humanos.

Ligação a proteínas: Talvez, o fator mais importante na determinação da penetração tecidual de antimicrobianos seja a ligação a proteínas plasmáticas. A ligação a proteínas é o resultado de interações entre o fármaco e um grande número de sítios hidrofóbicos e iônicos presentes nas mesmas. A ligação entre o fármaco e a proteína é rápida e reversível, formando um equilíbrio entre a fração livre e a fração ligada (GODDARD e col., 1998). A fração livre é capaz de atravessar os capilares sanguíneos e interagir com a bactéria, sendo responsável pela ação

farmacológica, enquanto que a fração ligada não consegue atravessar as membranas, funcionando como depósito dinâmico do fármaco na corrente circulatória.

DUDLEY e col. (1990) estudaram o efeito da ligação a proteínas no espaço extravascular com relação à ação de dois antibióticos β -lactâmicos: a dicloxacilina, 96 % ligada a proteínas plasmáticas, e a cefalotina, 25 % ligada a proteínas plasmáticas, contra *S. aureus* num modelo capilar de infecção *in vitro*. A atividade das concentrações de antibiótico no espaço extravascular foi determinada quando este continha ou não proteínas. Os resultados obtidos mostraram que a atividade da dicloxacilina foi reduzida até 6 h após a administração do fármaco quando o espaço extravascular continha proteínas, enquanto o mesmo não foi observado para cefalotina que, pelo contrário, teve um aumento no efeito antimicrobiano. Os dados sugerem que, apesar dos fármacos com alta ligação a proteínas plasmáticas alcançarem altas concentrações totais no espaço extravascular, a ligação a proteínas reduz sua atividade durante os estágios iniciais do tratamento.

A relevância da ligação a proteínas na penetração de antibióticos β -lactâmicos dentro de fluidos corporais foi investigada por WOODNUT e col. (1995), examinando a distribuição de cinco antibióticos pertencentes a esta classe, dentro da linfa periférica e do plasma de coelhos. A amoxicilina e o ácido clavulânico têm uma baixa ligação a proteínas no plasma e na linfa. A ticarcilina tem uma ligação a proteínas maior no plasma que na linfa, enquanto a temocilina e a ceftriaxona apresentam ligação a proteínas concentração-dependente. A porcentagem de penetração da amoxicilina, do ácido clavulânico e da temocilina para a linfa foi de 89 %. A ticarcilina penetrou em menor grau e a ceftriaxona mostrou a penetração mais baixa. Esses resultados demonstraram que os antibióticos com baixa ligação a proteínas no plasma possuem boa penetração para a linfa, enquanto os demais, com alta ligação a proteínas, não penetram tão bem.

SHYU (1998), utilizando a técnica de formação de bolhas por sucção, estudou o efeito da ligação a proteínas plasmáticas na penetração de três cefalosporinas: cefocinida, com ligação a proteínas de 98 %, ceftiazoxima e cefotaxima, com ligação menor de 40 %. A concentração da cefocinida foi determinada por métodos microbiológicos utilizando *B. subtilis* ATCC 6633 como microrganismo teste. Os três fármacos foram administrados por infusão, com um intervalo de uma semana entre as doses. Como o alto grau de ligação resulta em menor disponibilidade do fármaco para difusão nos fluidos biológicos, observaram-se picos de concentração máxima para cefocinida, com alta ligação, mais demorados

(5 h após a dose) que os picos de concentração máxima obtidos para a ceftiazoxima e cefotaxima, com menor ligação, que foram alcançados uma hora e meia após a administração. O autor concluiu que o alto grau de ligação a proteínas plasmáticas da cefocinida, diminuiu a sua disponibilidade para o fluido de bolha cutânea e, presumivelmente, para o fluido intersticial.

Apesar da importância evidenciada da ligação a proteínas plasmáticas para a penetração de antibióticos, em geral, a ligação deve ser superior a 90 % para causar um efeito dramático na penetração tecidual (WISE, 1983).

Fatores relacionados ao local de infecção

As alterações teciduais oriundas da infecção como a lesão tecidual, a modificação do pH no local infectado, entre outros, ou oriundas da inflamação provocada pela presença do microrganismo infectante, tais como o aumento da permeabilidade capilar no local infectado, o aumento da temperatura local ou corporal, a formação de edema e o aumento no aporte sanguíneo, entre outros, podem modificar a penetração de agentes anti-infecciosos no sítio de infecção (NIX e col., 1991a; BERGERON, 1986).

A vascularização sanguínea no local da infecção é um aspecto relevante para penetração do fármaco. Uma perfeita circulação local permite melhor ação do fármaco. Bactérias ou produtos resultantes destas podem alterar o suprimento vascular. Pode-se citar, como exemplo, as endotoxinas, componentes da parede celular bacteriana, que podem interromper a circulação local e prevenir o estabelecimento de concentrações efetivas.

JOINER e col. (1981) observaram a influência da inflamação nas concentrações teciduais de cinco antibióticos β -lactâmicos: cefalotina, moxalactama, cefoxitina, cefoperazona, ceforamida e carbenicilina em abscessos estéreis ou infectados por *Bacteroides fragilis*, em camundongos. Nos abscessos estéreis, todos os antibióticos alcançaram níveis mais altos que os determinados no soro. Nos abscessos infectados, níveis mais baixos dos antibióticos foram encontrados, provavelmente, pela inativação destes devido à presença de β -lactamase. Logo, os autores concluíram que a inflamação diminui as concentrações teciduais de alguns antibióticos analisados devido à degradação local dos mesmos. Nestas condições, a avaliação da penetração fica prejudicada.

Alguns autores sugerem que um aspecto importante que deve ser avaliado em estudos de penetração de antibióticos em tecidos é a geometria do compartimento. Eles consideram a existência de uma relação entre a área superficial da rede vascular por onde o antibiótico difunde e o

volume do fluido no compartimento ou tecido por ela suprida.

VAN ETTA e col. (1982) estudaram o efeito da relação área superficial (AS) e volume (V) sobre a penetração do antibiótico cefapirina para o espaço extravascular em modelo *in vitro*. Neste trabalho, os autores simularam diferentes compartimentos do organismo, com volumes e áreas superficiais diferentes, gerando relação AS/V de 3, 7, 10, 100. Os autores verificaram que, quanto maior a relação AS/V, mais os perfis dos compartimentos periféricos mimetizam o perfil do compartimento doador, que simulava o compartimento central no organismo. O perfil de concentração por tempo do compartimento com relação AS/V de 100 foi igual ao do compartimento doador.

RYAN e col. (1986), na tentativa de explicar a relação entre os níveis no plasma e nos tecidos em modelos diferentes, dividiram os modelos em duas categorias. A primeira são modelos que usam compartimentos naturais (linfa, fluidos subcutâneos e intersticiais), com pequeno volume de fluido tecidual, e a outra são modelos com compartimentos artificiais, em que há grande quantidade de fluido (bolhas cutâneas, fios de algodão). Em geral, os compartimentos naturais têm razão AS/V mais alta que nos compartimentos artificiais. Nos compartimentos com alta AS/V encontrou-se que os picos de concentração nos tecidos foram atingidos rapidamente; que os picos de concentração nos fluidos foram altos e que o tempo de meia vida no tecido foi similar ao do plasma. Nos compartimentos com baixa AS/V, os picos de concentração do antibiótico no tecido foram alcançados lentamente e foram mais baixos que os encontrados no soro e o tempo de meia vida foi prolongado. Eles concluíram que, as diferenças entre os níveis no soro e nos tecidos nos vários modelos podem ser explicadas pela geometria do compartimento e que os níveis no plasma podem prever os níveis nos tecidos quando a razão AS/V for alta.

MÜLLER e col. (1999) avaliaram a penetração de ciprofloxacino no espaço intersticial de lesão infectada de pés, cronicamente inflamados, de pacientes diabéticos não insulina-dependentes, bem como, em tecido similar não infectado e não inflamado do mesmo paciente. A coleta das amostras do fármaco no espaço intersticial foi realizada através de microdialise. O ciprofloxacino foi administrado aos pacientes por infusão de curta duração (20 min) numa dose de 200 mg. As amostras de sangue e microdialisado de tecido inflamado e sadio foram coletadas em tempos pré-determinados e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A avaliação da concentração de ciprofloxacino em função do tempo para os três tipos de amostras evidenciou a não existência de diferença

significativa entre as concentrações plasmáticas livres e teciduais em local inflamado e sadio. Portanto, os autores concluíram que a penetração de antibióticos no tecido inflamado é semelhante à que ocorre no tecido sadio, nas condições experimentais investigadas. Para estes autores, os resultados refutam a hipótese de RYAM e col. (1986), de que o processo de distribuição seja alterado ou comprometido devido às barreiras de difusão no tecido inflamado.

Diante da controvérsia dos dados apresentados por diferentes autores, mais estudos são necessários para melhor avaliar a significância dos fatores relacionados ao processo infeccioso/inflamatório sobre a penetração tecidual de antibióticos.

CONCLUSÕES

Vários modelos experimentais *in vivo* tem sido empregados na avaliação da penetração tecidual de antimicrobianos. Os modelos clássicos, como aqueles que utilizam homogenizados de tecidos, fluidos fisiológicos ou patológicos e fluidos obtidos experimentalmente, medem as concentrações totais do antimicrobiano e, por isso, podem confundir as previsões de concentrações efetivas no local de ação. Portanto, a microdiálise é o método atualmente mais promissor para avaliar a penetração tecidual de antimicrobianos, pois é capaz de medir apenas as concentrações livres dos mesmos, que são as responsáveis pela ação terapêutica.

A penetração tecidual de antibióticos é afetada por vários fatores, sejam eles relacionados ao fármaco ou ao local de infecção. No caso de fatores relativos ao fármaco, provavelmente o mais importante é a ligação a proteínas plasmáticas, pois ela determina diretamente a penetração tecidual do fármaco. Quanto maior a ligação a proteínas, menor a penetração. Quanto aos fatores relacionados ao local de infecção, grande relevância é dada às alterações oriundas do processo infeccioso/inflamatório e a geometria do compartimento. Os dados da literatura sobre o processo infeccioso/inflamatório são contraditórios, necessitando de mais investigação para avaliar a influência real deste na penetração tecidual de antimicrobianos.

Apesar dos antibióticos estarem em uso há muito tempo, o conhecimento dos fatores que influenciam sua penetração em tecidos infectados ainda não foi completamente explorado, sendo necessário aprofundar as pesquisas neste sentido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARZA, M. Principles of Tissue Penetration of Antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 8, supl. C, p. 7-28, 1981.

BENET, L. Z.; KROETZ, D. L.; SHEINER, L. B. Farmacocinética: A dinâmica da absorção, distribuição e eliminação de fármacos. In: HARDMAN, L. e col. (Ed.) *Goodman e Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 1, p. 3-20.

BENVENISTE, H. Brain Microdialysis. *Journal Neurochemistry*, v. 52, n. 6, p. 1667-1679, 1989.

BENVENISTE, H.; HÜTTEMEIER, P. C. Microdialysis - Theory and Application. *Progress in Neurobiology*, v. 35, p. 195-215, 1990.

BERGAN, T. Pharmacokinetics of Tissue Penetration of Antibiotics. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 3, n. 1, p. 45-66, 1981.

BERGERON, M. G. Tissue Penetration of Antibiotics. *Clinical Biochemistry*, v. 19, p. 90-100, 1986.

CHAMBERS, H. F.; SANDE, M. A. Quimioterapia das doenças microbianas: considerações gerais. In: HARDMAN, L. e col. (Ed.) *Goodman e Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 43, p.757-776.

DALLA COSTA, T.; NOLTING, A.; KOVAR, A.; DERENDORF, H. Determination of Free Interstitial Concentration of Piperacillin-Tazobactam Combinations by Microdialysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 42, p. 769-778, 1998.

DINIZ, A. *Avaliação farmacocinética da piperacilina em músculo de ratos infectados com E. coli*. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, 2000. Dissertação de Mestrado.

DUDLEY, M. N.; BLASER, J.; GILBERT, D.; ZINNER, S. H. Significance of "Extracellular" Protein Binding for Antimicrobial Pharmacodynamics in an *in vitro* Capillary Model of Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 34, n. 1, p. 98-101, 1990.

ELMQUIST, W. F.; SAWCHUK, R. J. Application of Microdialysis in Pharmacokinetics Studies. *Pharmaceutical Research*, v. 14, n. 3, p. 267-288, 1997.

GODDARD, A. F.; ERAH, P.O.; BARRET, D. A.; SHAW, P.N.; SPILLER, R. C. The Effect of Protein Binding and Lipophilicity of Piperacillin on their *in vitro* Across Gastric Mucosa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 41, p. 231-236, 1998.

JOHANSEN, M. J.; NEUMAN, R. A.; MADDEN, T. The Use of Microdialysis in Pharmacokinetics

- and Pharmacodynamics. *Pharmacotherapy*, v. 17, n. 3, p. 464-481, 1997.
- JOINER, K. A.; LOWE, B.R.; DZINK, J. K.; BARTLETT, J. G. Antibiotic Levels in Infected and Sterile Subcutaneous Abscess in Mice. *Journal of Infectious Diseases*, v. 143, p. 4887-494, 1981.
- KOVAR, A.; DALLA COSTA, T.; DERENDORF, H. Comparison of Plasma and Free Tissue Levels of Ceftriaxone in Rats by Microdialysis. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 86, n. 1, p. 52-56, 1997.
- LIMBERG, J.; LEBEL, M.; DERENDORF, H. Evaluation of Free Tissue Concentrations of Fleroxacin After Oral Administration. *Pharmaceutical Research*, v. 7, n. 4, p. 423-424, 1990.
- MEULEMANS, A.; PAYCHA, F.; HANNOUN, P.; VULPILLAT, M. Measurement and Clinical and Pharmacokinetic Implications of Diffusion Coefficients of Antibiotics in Tissues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 33, n. 8, p. 1286-1290, 1989.
- MÜLLER, M.BRUNNER, M.; HOLLENSTEIN, U.; JOUKHADAR, C.; SCHMID, R.; MIWAR, E.; EHRINGER, H. EICHLER, G. Penetration of Ciprofloxacin into the Interstitial Space of Inflamed Foot Lesions in Non-insulin-dependent Diabetes mellitus patient. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, n.8, p.2056-2058, 1999.
- NIX, D.E. Intrapulmonary Concentrations of Antimicrobial Agents. *Infectious Diseases Clinical North of America*, v. 12, n. 3, p. 631-647, 1998.
- NIX, D. E.; GOODWIN, S. D.; PELOQUIN, C. A.; ROTELLA, D. L.; SCHENTAG, J.J. Antibiotic Tissue Penetration and its Relevance: Models of Tissue Penetration and their Meaning. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 35, n. 10, p. 1947-1952, 1991a.
- NIX, D. E.; GOODWIN, S. D.; PELOQUIN, C. A.; ROTELLA, D.L.; SCHENTAG, J.J. Antibiotic Tissue Penetration and its Relevance: Impact of Tissue Penetration of Infection Response. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 35, n. 10, p. 1953-1959, 1991b.
- NOLTING, A.; DALLA COSTA, T.; VISTELLE, R.; RAND, K. H.; DERENDORF, H. Determination of Free Extracellular Concentration of Piperacillin by Microdialysis. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 85, n. 4, 1996.
- RYAN, D. M.; CARS, O.; HOFFSTEDT, B. The Use of Antibiotic Serum Levels to Predict Concentrations in Tissues. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 8, p. 381-388, 1986.
- SCHÄFER- KORTING, M. Skin Blister Fluid- an Access to the Peripheral Compartment- Implications of a Study on the Behavior of Bendroflumethiazide in Rats. *Arzneimittel Forschung*, v. 35, n. 11, p. 1828-1831, 1985.
- SHYU, M. N. Effect of Protein Binding on Drug Penetration into Blister Fluid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 32, n. 1, p. 128-130, 1998.
- TAVARES, W. *Manual de antibióticos e quimioterápicos*. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1996.
- VAN ETTA, L.; PETERSON, L.R.; FASCHING, C.E.; GERDING, D.N. Effect of the Ratio of Surface Area to Volume on the Penetration into Extravascular Spaces in an *in vitro* Model. *Journal Infectious Diseases*. v. 146, n. 3, p. 423-428, 1982.
- WISE, R. Protein Binding of β -lactams: the Effects on Activity and Pharmacology Particularly Tissue Penetration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 12, n. 1, p. 1-18, 1983.
- WISE, R.; LISTER, D.; McNULTY, C. A. M.; GRIGGS, D.; ANDREWS, J. M. The Comparative Pharmacokinetics and Tissue Penetration of Four Quinolones Including Intravenously Administered Enoxacin. *Infectious Diseases*, v. 14, suppl. 3, p. 196-202, 1986.
- WOODNUTT, G.; BERRY, V.; MIZEN, L. Effect of Protein Binding on Penetration of β -lactams into Rabbit Peripheral Lymph. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, n. 12, p. 2678-2683, 1995.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelas bolsas de Mestrado e Produtividade em Pesquisa e à PROPESQ/UFRGS pela bolsa de Iniciação Científica.

Endereço para correspondência:

Profª.Dr. Teresa Dalla Costa
Faculdade de Farmácia/UFRGS
Av. Ipiranga, 2752
90610-000 Porto Alegre RS
e-mail: teresadc@farmacia.ufrgs.br

Recebido em: 5.3.2001

Aceito em: 19.4.2001

Revisão final: 21.5.2001