

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

**MODELAGEM FARMACOCINÉTICA-
FARMACODINÂMICA DAS FLUORQUINOLONAS
LEVOFLOXACINO E GATIFLOXACINO**

LEANDRO TASSO

Porto Alegre, 2008

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

**MODELAGEM FARMACOCINÉTICA-
FARMACODINÂMICA DAS FLUORQUINOLONAS
LEVOFLOXACINO E GATIFLOXACINO**

Tese apresentada por **Leandro Tasso**
para a obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof^a. Dr^a. Teresa Dalla Costa

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405, no Laboratório de Tecnologia Bioquímica e no Centro Bioanalítico de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre, com financiamento da FAPERGS e CNPq.

Dedico este trabalho à minha mãe e à minha namorada,
com amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À prof^a. Dr^a. Teresa Dalla Costa pela orientação nesta tese, pela disponibilidade em discutir os resultados constantemente, por acreditar no meu trabalho em momentos complicados, pela paciência e incentivo, bem como pelas oportunidades concedidas. Sempre, muito obrigado;

À minha mãe Nilce, pelo incentivo e pelo amor dedicado, pelo forte exemplo de que quando se quer é preciso esforço e muita determinação para conquistar;

À minha namorada Fran, pelos vários momentos de felicidade, pelo sorriso lindo que me encorajou nas horas difíceis e pelo coração grande que soube entender os vários momentos de minha ausência. A você o meu obrigado, o meu amor por inteiro;

Ao meu sogro Zélio, minha sogra Rosângela e meu cunhado Gustavo, pela acolhida carinhosa na família e pelo interesse no meu trabalho;

Às minhas bolsistas Clarissa Bettoni e Laura de Oliveira, pela importante ajuda prestada no trabalho e em especial à bolsista Cristiane de Andrade, pela dedicação e envolvimento neste;

Aos colegas do laboratório 405, tanto aqueles que já terminaram seus trabalhos quanto aqueles que ainda o fazem, pela oportunidade de conviver e auxílio de alguma forma;

Aos colegas do grupo de farmacocinética, pela ajuda em experimentos, pela discussão nos seminários e pelos momentos de lazer, bem como pelo convívio neste tempo que deixará saudades. Sucesso a todos!

A todos os amigos que fazem parte da minha vida, de perto ou de longe, bem como aos meus alunos e colegas professores que torceram por mim;

Aos professores e alunos dos laboratórios de Controle de Qualidade e Tecnologia Bioquímica, pelo empréstimo de seus espaços e equipamentos;

Ao professor Dr. Pedro D'Azevedo por disponibilizar o microrganismo usado neste estudo;

Aos professores que avaliaram e contribuíram nas diferentes etapas deste percurso, desde o pré-projeto até a defesa desta tese;

A todos que desejaram sucesso e boa sorte!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2: REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1. Índices Farmacocinéticos/Farmacodinâmicos.....	11
2.2. Microdiálise.....	18
2.3. Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica de Antimicrobianos.....	30
2.4. Tratamento da Pneumonia Adquirida na Comunidade.....	36
2.5. Dosagens de Fluorquinolonas para o Tratamento da Pneumonia Adquirida na Comunidade.....	40
2.6. Quinolonas.....	42
2.6.1. Levofloxacino.....	43
2.6.2. Gatifloxacino.....	44
2.7. Propriedades Farmacocinéticas e Farmacodinâmicas do Levofloxacino e do Gatifloxacino.....	46
2.8. Referências.....	55
CAPÍTULO 3: High performance liquid chromatography for quantification of gatifloxacin in rat plasma following automated on-line solid phase extraction	71
CAPÍTULO 4: Pharmacokinetic plasma profile and bioavailability evaluation of gatifloxacin in rats	79
CAPÍTULO 5: Evaluation of gatifloxacin penetration into skeletal muscle and lung by microdialysis in rats	85
CAPÍTULO 6: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic modeling of levofloxacin and gatifloxacin bactericidal activity against <i>Streptococcus pneumoniae</i> recurrent in Community-acquired pneumonia	93
CAPÍTULO 7: Considerações finais	119
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Índices farmacocinéticos e farmacodinâmicos empregados na avaliação da eficácia de antimicrobianos.....	13
Figura 2.	Sonda de microdiálise inserida em tecido.....	19
Figura 3.	Perfis de concentrações plasmáticas totais, livres musculares e pulmonares após administração intravenosa <i>bolus</i> de 50 mg/kg do cefaclor.....	24
Figura 4.	Perfis de concentrações plasmáticas totais, livres pulmonares, livres musculares e livres plasmáticas calculadas, após administração intravenosa de 10 mg/kg, 20 mg/kg e 260 µg/h (infusão contínua) de cefpodoxima.....	25
Figura 5.	Perfis de concentrações livres para o imipenem em pulmão e músculo esquelético sadio, e soro, após a infusão intravenosa de 120 mg/kg do imipenem por 30 minutos.....	26
Figura 6.	Perfis de concentrações para o meropenem em fluido intersticial de pulmão infectado, músculo esquelético sadio, e soro após a quinta administração de 1 grama de meropenem em infusão de 20 minutos.....	28
Figura 7.	Perfis de concentrações plasmáticas totais e livres musculares após administração de 500 mg de cefaclor como forma farmacêutica sólida de liberação imediata.....	29
Figura 8.	Curva do efeito antibacteriano da piperacilina nas com concentrações de pico de 50 µg/mL e 100 µg/mL comparadas com o controle.....	33
Figura 9.	Estrutura molecular do levofloxacino.....	44
Figura 10.	Estrutura molecular do gatifloxacino.....	44
Figura 11.	Perfis das concentrações plasmáticas médias dos enantiômeros do gatifloxacino após administração oral de 200, 400, 600 e 800 mg do gatifloxacino racemato – dose única.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classes de fármacos/exemplos relacionados com os índices farmacocinéticos/farmacodinâmicos mais relevantes.....	13
Tabela 2.	Antimicrobianos avaliados por microdiálise em humanos em diferentes biofases.....	21
Tabela 3.	Microrganismos mais comuns em PAC, em ordem decrescente.....	38
Tabela 4.	Tratamento empírico em PAC para adultos imunocompetentes.....	40
Tabela 5.	Parâmetros farmacocinéticos do levofloxacino em humanos após administração de dose única ou múltipla intravenosa ou oral	48
Tabela 6.	Parâmetros farmacocinéticos do gatifloxacino em humanos após administração de dose múltipla oral.....	50
Tabela 7.	Parâmetros farmacocinéticos do gatifloxacino em humanos após administração de dose única intravenosa ou oral.....	51
Tabela 8.	Relação fluido-tecido/soro do gatifloxacino em humanos.....	52
Tabela 9.	Atividade <i>in vitro</i> do levofloxacino contra <i>Streptococcus pneumoniae</i>	54
Tabela 10.	Atividade <i>in vitro</i> do gatifloxacino contra <i>Streptococcus pneumoniae</i>	54

RESUMO

Objetivo: O objetivo geral deste trabalho foi estabelecer modelo farmacocinético-farmacodinâmico (modelo PK/PD) para descrever o perfil temporal do efeito bactericida do levofloxacino e do gatifloxacino contra *Streptococcus pneumoniae*. **Método:** Para alcançar este objetivo as seguintes etapas foram realizadas: i) foram validadas metodologias analíticas de SPE-HPLC para o gatifloxacino e HPLC para o levofloxacino e o gatifloxacino para quantificação destes em amostras de plasma, microdialisado tecidual e caldo de cultura; ii) foi avaliada a farmacocinética do gatifloxacino em roedores nas doses de 6 e 12 mg/kg via oral e 6 mg/kg via intravenosa (i.v.) e a biodisponibilidade oral foi determinada; iii) foram estabelecidas as condições ideais para microdiálise do gatifloxacino e as taxas de recuperação *in vitro*, por diálise (EE), retrodiálise (RD) e fluxo líquido zero (NNF) e *in vivo*, em tecido pulmonar e muscular, por retrodiálise e fluxo líquido zero. Essas recuperações foram utilizadas para determinar a penetração pulmonar do gatifloxacino após a administração i.v. *bolus* de 6 mg/kg a ratos Wistar sadios; iv) foram simuladas as concentrações livres pulmonares esperadas para humanos após tratamento com diferentes regimes de dosagem para o levofloxacino e o gatifloxacino em modelo de infecção *in vitro* frente a *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619. Simulações de concentrações constantes múltiplas do MIC de cada fármaco também foram realizadas. As curvas de morte bacteriana por tempo obtidas foram modeladas com modelo PK/PD de E_{max} modificado, com auxílio do programa Scientist® v 2.01. **Resultados e Conclusões:** i) Os métodos analíticos por SPE-HPLC e HPLC para quantificação do gatifloxacino e do levofloxacino foram validados. As curvas foram lineares na faixa de 20 a 600 ng/mL para plasma e microdialisado tecidual de gatifloxacino e na faixa de 250 a 6000 ng/mL para caldo de cultura para ambos os fármacos, com $r > 0,99$, independente do método desenvolvido. Em plasma e microdialisado, a exatidão foi $\geq 94,3$ %. A recuperação do gatifloxacino dos cartuchos de extração em fase sólida variou entre 95,6 e 99,7 %. A precisão não excedeu 5,8 % do CV. Em caldo de cultura, a exatidão foi $\geq 92,0$ % e 93,4 % para o gatifloxacino e o levofloxacino, respectivamente. A precisão não excedeu 3,2 % e 4,2 % do CV para o levofloxacino e o gatifloxacino, respectivamente; ii) A avaliação farmacocinética demonstrou que os modelos abertos de dois compartimentos e de um compartimento com absorção de primeira ordem descreveram adequadamente os perfis plasmáticos após administração do gatifloxacino pelas vias i.v. e oral nas doses de 6 e 12 mg/kg, com CL de $0,9 \pm 0,2$ e $1,0 \pm 0,3$ L/h/kg, $t_{1/2}$ de $3,3 \pm 0,8$ e $3,7 \pm 0,3$ h e Vd de $2,8 \pm 0,4$ e $3,1 \pm 1,0$ L/kg, respectivamente. Os parâmetros determinados por abordagem compartimental e não compartimental não diferiram significativamente para as duas vias investigadas ($\alpha = 0,05$). A $ASC_{0-\infty}$ foi de $4,1 \pm 1,6$ e $6,6 \pm 1,3$ $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ após administração oral e i.v. das doses de 12 e 6 mg/kg, respectivamente, levando a uma biodisponibilidade de 31%. A constante de velocidade de absorção foi alta ($5,0 \pm 1,8$ h^{-1}) e a farmacocinética mostrou-se linear na faixa de doses investigada; iii) A recuperação das

sondas de microdiálise *in vitro* por EE e RD para 80, 160 e 400 ng/mL de gatifloxacino foi de $33,5 \pm 1,3\%$, $33,1 \pm 1,2\%$, $31,8 \pm 2,7\%$ e $31,4 \pm 2,6\%$, $33,1 \pm 2,2\%$, $30,6 \pm 3,3\%$, respectivamente. *In vivo* a recuperação por RD no músculo esquelético e pulmão de ratos Wistar foi de $29,1 \pm 1,0\%$ e $30,7 \pm 1,4\%$, respectivamente. A recuperação por NNF *in vitro* e *in vivo* foi de $30,9 \pm 2,9\%$ e $29,0 \pm 0,8\%$, respectivamente. Desse modo, concluiu-se que a recuperação foi constante e independente do método ou meio utilizado. Os perfis de concentração livre no músculo, pulmão e plasma de ratos Wistar foram virtualmente superpostos após dose de 6 mg/kg i.v., resultando em ASC similares de 3888 ± 734 ng.h/mL, 4138 ± 1071 ng.h/mL e 3805 ± 577 ng.h/mL, respectivamente ($\alpha = 0,05$). O fator de distribuição tecidual foi de 1,02 e 1,08 para músculo e pulmão, respectivamente; iv) O modelo PK/PD empregado foi capaz de descrever o efeito do levofloxacino e do gatifloxacino contra o *Streptococcus pneumoniae in vitro* para todas as simulações investigadas. O EC_{50} médio para o levofloxacino ($3,57 \pm 2,16$ mg/L) foi significativamente maior que o do gatifloxacino ($0,95 \pm 0,56$ mg/L) quando regimes de doses múltiplas foram simulados. O mesmo foi observado para concentrações constantes, sendo o $EC_{50,levofloxacino} = 2,75 \pm 0,45$ mg/L e $EC_{50,gatifloxacino} = 1,03 \pm 0,52$ mg/L. O k_{max} foi estatisticamente semelhante para ambos os fármacos independente se foram simuladas concentrações flutuantes ($k_{max,levofloxacino} = 0,40 \pm 0,19$ h⁻¹; $k_{max,gatifloxacino} = 0,48 \pm 0,15$ h⁻¹) ou concentrações constantes ($k_{max,levofloxacino} = 0,34 \pm 0,06$ h⁻¹; $k_{max,gatifloxacino} = 0,39 \pm 0,23$ h⁻¹). Nenhum dos índices PK/PD foi capaz de prever o desfecho da infecção para todas as situações investigadas. O modelo PK/PD desenvolvido permitiu a comparação entre as duas fluorquinolonas e de diferentes posologias para cada fármaco, podendo ser utilizado para simular o efeito temporal de regimes de dosagem alternativos bem como para otimização da posologia desses fármacos para o tratamento da pneumonia adquirida na comunidade.

Palavras-chave: levofloxacino, gatifloxacino, microdiálise pulmonar, modelagem PK/PD, modelo de infecção *in vitro*.

ABSTRACT

Pharmacokinetic-Pharmacodynamic modeling of the fluoroquinolones levofloxacin and gatifloxacin

Objective: The aim of this work was to establish a pharmacokinetic-pharmacodynamic model (PK/PD model) to describe the profile of bactericidal effect over time of levofloxacin and gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. **Method:** To achieve this goal the following steps were carried out: i) an analytical method of SPE-HPLC to quantify gatifloxacin in plasma and tissue microdialysates, and an HPLC method for measuring levofloxacin and gatifloxacin in culture broth samples were developed and validated; ii) the pharmacokinetics of gatifloxacin in rodents after intravenous (6 mg/kg) and oral (6 and 12 mg/kg) administration was assessed as well as the oral bioavailability of the drug was determined; iii) microdialysis conditions for gatifloxacin were established and the recovery rates *in vitro* by dialysis (EE), retrodialysis (RD) and no-net-flux (NNF), and *in vivo* in lung and skeletal muscle tissue by RD and NNF were determined. Gatifloxacin tissue penetration in lung after intravenous administration (6 mg/kg) to healthy Wistar rats was determined; iv) levofloxacin and gatifloxacin free lung concentrations expected in humans following different dosing regimens of the drugs were simulated using *Streptococcus pneumoniae* ATCC[®] 49619 *in vitro* model of infection. The effect of constant concentrations multiples of MIC were also investigated. The time-kill curves obtained were modeled using an E_{max} modified model using Scientist[®] v. 2.01 software. **Results and Conclusions:** i) The analytical methods by SPE-HPLC and HPLC for quantifying gatifloxacin and levofloxacin were validated. Calibration curves were linear between 20-600 ng/mL for gatifloxacin in plasma and tissue microdialysate samples and between 250-6000 ng/mL for broth media for both drugs, with $r > 0.99$ independently of the method considered. The accuracy was $\geq 94.3\%$ for plasma and microdialysate. Gatifloxacin recovery from the solid phase extraction cartridges ranged from 95.6 to 99.7%. The precision did not exceed 5.8% of the CV. In broth media the accuracy was $\geq 92.0\%$ and 94.3% for gatifloxacin and levofloxacin, respectively. The precision did not exceed 3.2% and 4.2% of the CV for levofloxacin and gatifloxacin, respectively; ii) Gatifloxacin experimental plasma profiles in rats were adequately fitted to a two-compartment model after intravenous and to a one compartment model with first order absorption after oral dosing. The total clearance (0.9 ± 0.2 and 1.0 ± 0.3 L/h/kg), the terminal half-life (3.3 ± 0.8 and 3.7 ± 0.3 h) and the apparent volume of distribution (2.8 ± 0.4 and 3.1 ± 1.0 L/kg) were statistically similar ($\alpha = 0.05$) after i.v. and oral administration, by both model independent and compartmental approaches. The area under the curve was reduced after oral dosing (4.1 ± 1.6 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) in comparison to i.v. dosing (6.6 ± 1.3 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) leading to an oral bioavailability of 31%. The absorption was fast, with a constant rate of 5.0 ± 1.8 h^{-1} . The results evidenced the linear pharmacokinetics of gatifloxacin in rodents in the dose range investigated; iii) Microdialysis recoveries determined *in vitro* by EE and RD at 80, 160 and 400 ng/mL resulted in $33.5 \pm 1.3\%$,

33.1 ± 1.2%, 31.8 ± 2.7% and 31.4 ± 2.6%, 33.1 ± 2.2%, 30.6 ± 3.3%, respectively. *In vivo* recovery by RD in Wistar rat's skeletal muscle and lung were 29.1 ± 1.0% and 30.7 ± 1.4%, respectively. Recoveries by no-net-flux *in vitro* and *in vivo* resulted in recoveries of 30.9 ± 2.9% and 29.0 ± 0.8%, respectively. In this way, it was shown that gatifloxacin recovery was constant and independent of the method or media used. Free skeletal muscle, lung and plasma profiles were virtually superimposed after i.v. administration of gatifloxacin 6 mg/kg dose resulting in similar area under the curve of 3888 ± 734 ng.h/mL, 4138 ± 1071 ng.h/mL and 3805 ± 577 ng.h/mL, respectively ($\alpha = 0.05$). The tissue distribution factors were determined to be 1.02 and 1.08 for muscle and lung, respectively; iv) The PK/PD model used was able to describe the effect of levofloxacin and gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae in vitro* for all the regimens investigated. Levofloxacin EC₅₀ (3.57 ± 2.16 mg/L) was higher than gatifloxacin (0.95 ± 0.56 mg/L) when multiple dosing regimens were simulated. Using constant concentrations, levofloxacin EC₅₀ was also higher than gatifloxacin (EC_{50,levofloxacin} = 2.75 ± 0.45 mg/L; EC_{50,gatifloxacin} = 1.03 ± 0.52 mg/L). The k_{max} was statistically similar for both drugs independent of whether fluctuating (k_{max,levofloxacin} = 0.40 ± 0.19 h⁻¹; k_{max,gatifloxacin} = 0.48 ± 0.15 h⁻¹) or constant concentrations (k_{max,levofloxacin} = 0.34 ± 0.06 h⁻¹; k_{max,gatifloxacin} = 0.39 ± 0.23 h⁻¹) were simulated. None of the PK/PD indices was capable of predicting the infection outcome for all the situations investigated. The PK/PD model developed allowed not only the comparison between the fluoroquinolones effect but also the comparison of different dosing regimes for the same drug and can be used for simulating alternative regimens and optimizing therapy of these drugs to treat community-acquired pneumonia.

Key-words: levofloxacin, gatifloxacin, lung microdialysis, PK/PD modeling, *in vitro* infection model.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

A pneumonia é um processo inflamatório exclusivo ou predominante do parênquima pulmonar, sem reação granulomatosa ou necrose ostensiva (SILVA & PALOMBINI, 2001), a qual pode ser classificada como pneumonia adquirida na comunidade (PAC) ou adquirida no hospital (nosocomial). As pneumonias adquiridas na comunidade são aquelas que ocorrem fora do ambiente hospitalar ou até as primeiras 48 horas após a hospitalização do paciente, sendo doenças freqüentes, especialmente em pacientes idosos e imunodeprimidos (VIRGÍLIO, 1999).

Embora melhorias no tratamento antimicrobiano sejam obtidas com novos representantes do arsenal terapêutico, a CAP permanece sendo uma causa de mortalidade e morbidade mundial (COLICE *et al.*, 2004). O aumento da prevalência de resistência aos macrolídeos e β -lactâmicos por bactérias que causam infecções respiratórias determinou a necessidade de agentes antimicrobianos mais efetivos, o que levou ao desenvolvimento das novas fluorquinolonas. Estas, por sua vez, combinam atividade contra organismos gram-positivos, gram-negativos e patógenos respiratórios atípicos, além de excelente biodisponibilidade, boa penetração tecidual, longos tempos de meia-vida de eliminação, boa tolerabilidade e perfil de segurança favorável (JONES & MANDELL, 2002).

Para o tratamento da pneumonia, antimicrobianos específicos devem ser prescritos quando o diagnóstico etiológico é obtido. As decisões relacionadas à terapia específica são guiadas por várias considerações como espectro de atividade, farmacocinética, eficácia, perfil de segurança e custo do fármaco, além do isolamento do agente microbiano específico (FILE, 2003). Entretanto, a grande maioria dos casos recebe tratamento empírico.

Os pacientes com PAC sem necessidade de internação são tratados empiricamente, sendo a seleção de um regime antimicrobiano específico baseada no patógeno mais provável. Infecções no trato respiratório adquiridas na comunidade (RTIs) são comumente causadas por organismos gram-positivos (predominantemente *Streptococcus pneumoniae*), gram-negativos (*Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*) (GAVALDÀ *et al.*, 1997; OWENS & AMBROSE, 2000; SAELAND *et al.*, 2000; PFALLER *et al.*, 2001; KOETH *et al.*, 2002; ROUSSEAU, 2002; EBISU *et al.*, 2003; KUHNKE & LODE, 2004) e bactérias atípicas (*Chlamydia*

pneumoniae, *Legionella pneumophila* e *Mycoplasma pneumoniae*) (OWENS & AMBROSE, 2000; SAELAND *et al.*, 2000; ROUSSEAU, 2002; KUHNKE & LODE, 2004).

Um β -lactâmico ou uma fluorquinolona respiratória (levofloxacino, gatifloxacino ou moxifloxacino), deve ser utilizado em pacientes com PAC por superinfecção bacteriana, para cobertura contra *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e eventualmente *Staphylococcus aureus* (MANDELL *et al.*, 2003).

O tratamento de pacientes sem fatores de risco com PAC grave, sem risco para etiologia por pseudomonas, é semelhante ao sugerido para os tratados em enfermarias, isto é, um β -lactâmico (cefotaxima, ceftriaxona, ampicilina-sulbactam, ertapenem) mais um macrolídeo ou uma fluorquinolona respiratória (___, 2004). Entre as fluorquinolonas respiratórias usadas para tratamento da PAC causada principalmente pelo *Streptococcus pneumoniae* estão o gatifloxacino e o levofloxacino (FILE Jr, 2004).

O levofloxacino (terceira geração) e o gatifloxacino (quarta geração) apresentam amplo espectro de ação com potente atividade contra bactérias gram-positivas, incluindo *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilinas, bem como excelente atividade contra microrganismos gram-negativos e atípicos. Tanto o gatifloxacino quanto o levofloxacino estão indicados para o tratamento da PAC, entre outras infecções (FISH & NORTH, 2001).

Um dos principais objetos da investigação da terapia antimicrobiana é o estabelecimento das relações entre a concentração do fármaco na biofase e o efeito farmacológico alcançado por estas concentrações. Estas relações quantitativas entre um parâmetro farmacocinético – (PK) e um parâmetro microbiológico (farmacodinâmico – PD) são chamadas de índices PK/PD (MOUTON *et al.*, 2005). Os parâmetros farmacocinéticos utilizados para estabelecer os índices PK/PD são determinados, geralmente, a partir de dados de concentração plasmática total do fármaco, como pico de concentração (C_{max}) e área sob a curva de concentração (ASC). No entanto, mais adequado seria utilizar o conhecimento da fração livre plasmática, uma vez que somente esta fração é capaz de atravessar as membranas, atingir a biofase e exercer efeito farmacológico, ou da fração livre tecidual no local da infecção.

A medida das concentrações de antimicrobianos no sítio alvo é particularmente desejável em infecções bacterianas pulmonares, pois não se conhece se as posologias

dos antimicrobianos fornecem concentrações suficientes nos tecidos pulmonares que sejam adequadas para erradicar os microrganismos, uma vez que muitos regimes terapêuticos falham em tratar infecções no trato respiratório, apesar da atividade documentada *in vitro* para os mesmos (JOUKHADAR *et al.*, 2001a).

A técnica de microdiálise tem sido considerada uma ferramenta útil para a avaliação dos níveis de antimicrobianos disponíveis nos diversos tecidos do organismo, capazes de exercer ação antimicrobiana. Esta técnica permite a coleta do fármaco não ligado a proteínas, disponível no líquido intersticial, sem alterar a fisiologia do órgão ou tecido sob investigação, possibilitando a avaliação do perfil temporal de permanência do fármaco no tecido. Pode, ainda, ser utilizada para a avaliação comparativa da penetração de antimicrobianos em tecidos saudáveis e infectados, permitindo avaliar alterações na penetração do fármaco em situação patológica (JOUKHADAR *et al.*, 2001a).

Embora os índices PK/PD sejam conhecidos para as quinolonas, estes apresentam limitações como marcadores da eficácia clínica dos antimicrobianos. Estas limitações estão relacionadas à utilização de parâmetros farmacocinéticos relacionados com a concentração total do fármaco, como relatado acima, bem como com a escolha da concentração inibitória mínima (CIM) como parâmetro farmacodinâmico, uma vez que esse é determinado *in vitro*, em situação de concentração constante, e não reflete as flutuações de concentração do fármaco observadas no organismo (DERENDORF & MEIBOHM, 1999).

Para os antimicrobianos, a combinação matemática das propriedades farmacocinéticas (PK) e farmacodinâmicas (PD), através de modelagem PK/PD, permite descrever o efeito do fármaco no sítio de infecção no decorrer do tempo, possibilitando um estudo sistemático das interações entre o fármaco e o microrganismo. A modelagem permite ainda realizar comparações, cientificamente embasadas, entre diferentes doses e regimes de administração avaliados para o fármaco, gerando os parâmetros necessários para possibilitar previsões do efeito por tempo de posologias não investigadas. Assim, constitui-se em uma alternativa vantajosa na diminuição dos riscos de efeitos colaterais, redução dos custos com a antibioticoterapia, bem como na diminuição dos riscos de desenvolvimento de resistência bacteriana (MEIBOHM & DERENDORF, 1997).

Poucos trabalhos na literatura, no entanto, modelaram a cinética e a dinâmica de fármacos antimicrobianos, de forma a descrever o efeito bactericida no decorrer do tempo. Entre os antimicrobianos quinolônicos que tiveram seu efeito modelado, pode-se citar o norfloxacino (PALMA, 2003), em trabalho realizado em nosso grupo de pesquisa e o ciprofloxacino (DELACHER *et al.*, 2000; SCHUCK *et al.*, 2005). Entre os β -lactâmicos estão relatados a avaliação da piperacilina (NOLTING *et al.*, 1996), da ceftazidima (MOUTON *et al.*, 1997), da associação piperacilina-tazobactam (DALLA COSTA *et al.*, 1998), do cefaclor (DE LA PEÑA *et al.*, 2004) e da cefepima e cefpodoxima (LIU *et al.*, 2005).

Neste projeto, inicialmente se fará uma investigação para determinar os níveis livres teciduais do gatifloxacino em ratos saudáveis. Posteriormente, partindo-se das concentrações plasmáticas totais do gatifloxacino em humanos, calcular-se-ão as concentrações livres teciduais do fármaco esperadas para humanos, assumindo que a mesma relação entre os níveis livres plasmáticos e livres teciduais encontrados para ratos também ocorre em humanos. Para o levofloxacino utilizar-se-ão as concentrações livres pulmonares de humanos já descritas na literatura (HUTSCHALA *et al.*, 2005). Propõe-se realizar a modelagem PK/PD do levofloxacino e do gatifloxacino, após a administração de diferentes posologias dos fármacos, e correlacionar matematicamente estas concentrações livres com o efeito bactericida obtido em função do tempo transcorrido frente ao *Streptococcus pneumoniae*.

A modelagem permitirá estabelecer novos parâmetros farmacodinâmicos como K_{max} (velocidade máxima de morte bacteriana) e EC_{50} (concentração onde 50% do efeito máximo é medido), que possibilitarão comparar o gatifloxacino e o levofloxacino entre si.

Em nosso grupo de pesquisa a microdiálise já vem sendo utilizada como ferramenta para medir as concentrações livres de fármacos em diferentes biofases, como fígado, rins, carcinomas, cérebro e tecido muscular. Este projeto agrega a técnica de microdiálise pulmonar aos trabalhos do grupo. Além de ser uma técnica nova neste Programa de Pós-Graduação, não há relatos na literatura que contemplem a associação da microdiálise pulmonar com a modelagem farmacocinética-farmacodinâmica do levofloxacino ou gatifloxacino, sendo este, portanto, um trabalho inédito.

O objetivo geral deste trabalho é estabelecer modelo farmacocinético-farmacodinâmico para descrever o perfil temporal do efeito bactericida do levofloxacino e do gatifloxacino, através do estabelecimento da relação matemática entre o efeito farmacodinâmico de morte microbiana e as concentrações livres pulmonares de cada fármaco, e comparar o efeito farmacológico dessas fluorquinolonas frente ao *Streptococcus pneumoniae*.

Os objetivos específicos desta tese foram:

- Validar metodologia analítica por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência, acoplada à Extração em Fase Sólida (SPE-HPLC), com detecção por fluorescência, para doseamento do gatifloxacino em plasma de ratos e dialisado de tecido e por HPLC para caldo de cultura;
- Avaliar, por microdiálise, a penetração muscular e pulmonar do gatifloxacino em ratos Wistar saudáveis após a administração de dose única intravenosa do fármaco e correlacionar os níveis livres teciduais com os níveis plasmáticos totais;
- Simular, em modelo de infecção por *Streptococcus pneumoniae in vitro*, as concentrações livres plasmáticas de humanos, após administração do gatifloxacino, bem como as concentrações livres pulmonares do levofloxacino conhecidas para humanos e avaliar o efeito de morte bacteriana obtido;
- Determinar a correlação entre o efeito farmacodinâmico do levofloxacino e do gatifloxacino e as concentrações livres pulmonares, através de modelagem PK/PD, utilizando modelo matemático adequado, com o auxílio do programa de regressão não-linear Scientist[®] v.2.1 e comparar a atividade dos dois fármacos frente ao *Streptococcus pneumoniae*.

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de capítulos que contemplam as etapas desenvolvidas no projeto e foram submetidos à publicação como artigos científicos.

CAPÍTULO II: REVISÃO DE LITERATURA

A PAC é uma das infecções respiratórias que mais acomete a população mundial. Diferentes são as estratégias e classes terapêuticas empregadas no seu manejo, sendo as fluorquinolonas uma opção preferencial. Estas, por sua vez, apresentam características farmacocinéticas e farmacodinâmicas desejáveis para a terapia, porém as concentrações livres nas biofases de interesse, responsáveis pelo efeito farmacológico, nem sempre são conhecidas, o que pode ser obtido mediante o emprego da microdiálise. As concentrações livres podem ser utilizadas na modelagem PK/PD de fármacos. A modelagem PK/PD de antimicrobianos apresenta como uma de suas particularidades a previsão de resultados clínicos e microbiológicos, mesmo para esquemas posológicos ainda não investigados, o que não se consegue utilizando apenas informações baseadas nos índices PK/PD, os quais apresentam limitações como marcadores de eficácia clínica.

2.1. Índices Farmacocinéticos-Farmacodinâmicos (PK/PD)

Embora a eficácia clínica e a segurança permaneçam sendo os padrões ouro para comparar antimicrobianos, medidas farmacocinéticas e farmacodinâmicas têm sido empregadas com grande frequência. As medidas PK/PD são características dos fármacos e podem ser usadas para identificar o melhor agente terapêutico para uma indicação em particular (EBERT, 2004).

Os parâmetros farmacocinéticos de um fármaco definem a velocidade e a extensão de sua penetração na corrente circulatória e nos diversos sítios extravasculares, bem como a velocidade e a extensão da eliminação do mesmo. Estes parâmetros são determinados a partir da caracterização do perfil plasmático dos fármacos.

Os parâmetros farmacodinâmicos, por sua vez, definem a relação entre as concentrações do fármaco e seus efeitos, os quais podem ser benéficos (terapêuticos) ou adversos (tóxicos). Os parâmetros farmacodinâmicos podem ser quantificados *in vivo*, embora eles sejam mais frequentemente medidos *in vitro* quando o fármaco em estudo for um antimicrobiano. Neste caso, a CIM (concentração inibitória mínima) e a CBM (concentração bactericida mínima) são os parâmetros mais comumente avaliados. A medida do efeito antimicrobiano mais difundida é a CIM. Para um determinado microrganismo, a CIM representa a menor concentração de um agente microbiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo (CLSI, 2003). Esta medida é usada extensivamente na prática clínica para determinar quais antimicrobianos podem ser usados para tratar uma infecção causada por um patógeno específico que tenha sido isolado. Cada CIM obtida deve ser comparada com um valor de referência padrão, ou *breakpoint*, para interpretação. Para ser efetivo, um antimicrobiano precisa encontrar concentrações no sítio de infecção que excedam a CIM.

Pela combinação apropriada dos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos de um antimicrobiano específico, uma aproximação da atividade do fármaco *in vivo* pode ser obtida.

Vários índices PK/PD são utilizados para avaliar a eficácia clínica e microbiológica de um agente antimicrobiano: o tempo acima da concentração inibitória mínima ($t > CIM$), a razão pico de concentração e concentração inibitória mínima (C_{max}/CIM) e a razão entre a área sob a curva e a concentração inibitória mínima (ASC_{24}/CIM) (Figura 1). Para os antimicrobianos tais como os β -lactâmicos e glicopeptídeos, o $t > CIM$ é o índice PK/PD que melhor prediz os resultados clínicos, sendo considerados antimicrobianos com atividade tempo dependente, ou seja, o tempo de exposição da bactéria ao fármaco é que determinará o efeito obtido. Em contraste, conforme observado na Tabela 1, aminoglicosídeos e fluorquinolonas exibem atividade bacteriana dependente da concentração, onde os índices que melhor se correlacionam com a eficácia são C_{max}/CIM e ASC_{24}/CIM (DRUSANO *et al.*, 1993; FORREST *et al.*, 1993; RODVOLD & NEUHAUSER, 2001; AMINIMANIZANI *et al.*, 2001; LISTER, 2002a; SARAVOLATZ & LEGGETT, 2003). Segundo WOODNUTT (2000), altos índices C_{max}/CIM e ASC_{24}/CIM provavelmente são necessários para prevenir a seleção de mutantes resistentes. A compreensão destes parâmetros pode facilitar a seleção de antimicrobianos e otimizar regimes posológicos para obter efeito mais rápido, prevenir falhas no tratamento e minimizar o desenvolvimento de resistência (EBERT & CRAIG, 1990).

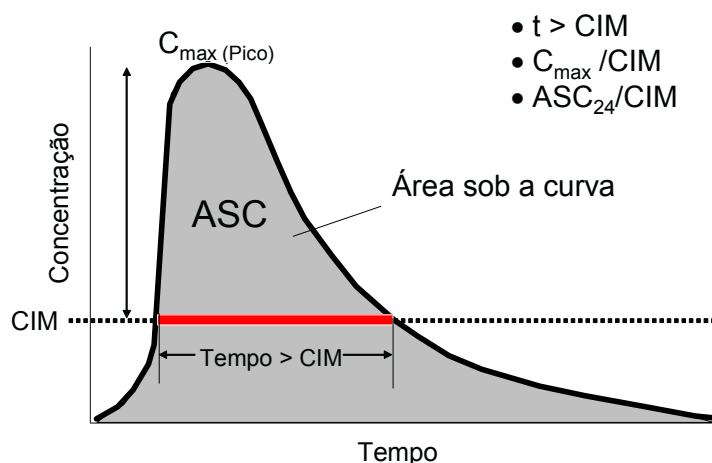


Figura 1. Índices farmacocinéticos/farmacodinâmicos empregados na avaliação da eficácia de antimicrobianos (Adaptado de CRAIG, 1998).

Tabela 1. Classes de fármacos/exemplos relacionados com os índices farmacocinéticos/farmacodinâmicos mais relevantes.

C_{max}/CIM	t > CIM	ASC₂₄/CIM
aminoglicosídeos	β-lactâmicos	macrolídeos
fluorquinolonas	vancomicina	fluorquinolonas
	linezolida	β-lactâmicos
	clindamicina	aminoglicosídeos
	eritromicina	vancomicina
	claritromicina	clindamicina
		doxicilina

(Adaptado de AMSDEN, 2004).

Após identificar qual é o índice PK/PD mais apropriado para cada classe de antimicrobianos, é importante conhecer a magnitude da variável requerida para a eficácia, isto é, o ponto de corte (*breakpoint*). Estudos em humanos têm começado a delinear os valores necessários para se obter eficácia clínica e microbiológica.

A idéia de comparar a exposição de um paciente a um antimicrobiano, por um período de 24 horas (ASC₂₄) e a CIM do microrganismo infectante, para ajustar a dose e garantir que o melhor índice fosse encontrado para obter a melhor atividade possível, foi primeiramente proposta por SCHENTAG e colaboradores no início dos anos 1990.

SCHENTAG e colaboradores (1991) descreveram um método geral para otimizar os esquemas de dosagens para o tratamento de infecções causadas por β-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos e postularam que valores de ASC₂₄/CIM seriam adequados para tratar qualquer infecção bacteriana utilizando essas classes de fármacos. DALLA COSTA & DERENDORF (1996), através de uma avaliação sistemática desta abordagem, mostraram que diferentes perfis de concentração sérica podem resultar na mesma área sob a curva inibitória por um período de 24 horas (ASCI), embora alguns dos regimes posológicos possam ser ineficazes. Através da derivação de uma equação precisa para calcular a ASCI os autores mostraram que, para a situação onde o vale de concentração no final do intervalo de dosagem igualava-se a CIM, a ASCI era independente da CIM, da dose e das concentrações séricas do fármaco, sendo determinada apenas pelo tempo de meia-vida do fármaco, o tempo de infusão e o intervalo de dose utilizado. Portanto, concluíram que o valor de *breakpoint* de 125 não parece ser válido para estas três classes de fármacos investigadas.

Com relação às quinolonas, vários estudos têm mostrado que o índice ASC_{24}/CIM ou, em alguns casos, C_{max}/CIM , são preditores da eficácia de antimicrobianos em estudos com modelos farmacocinéticos *in vitro* (MADARAS-KELLY *et al.*, 1996; LACY *et al.*, 1999; LISTER & SANDERS, 1999a; LISTER & SANDERS, 1999b), em animais (DRUSANO *et al.*, 1993; ANDES & CRAIG, 1998; BEDOS *et al.*, 1998a; BEDOS *et al.*, 1998b; FERNANDEZ *et al.*, 1999; NG *et al.*, 1999; ONYEJI *et al.*, 1999) e em estudos clínicos (FORREST *et al.*, 1993; FORREST *et al.*, 1997; PRESTON *et al.*, 1998; HIGHET *et al.*, 1999; AMBROSE *et al.*, 2001).

Existe, portanto, controvérsia na literatura sobre qual é o melhor índice, C_{max}/CIM ou ASC_{24}/CIM , para predizer a eficácia das fluorquinolonas. A discriminação entre estes dois índices é difícil devido a suas co-linearidades inerentes. Além disso, é possível que eles interajam. Por exemplo, em um estudo de DRUSANO e colaboradores (1993) a C_{max}/CIM das fluorquinolonas relacionou-se melhor com a sobrevivência quando este índice estava acima de 10, enquanto que a ASC_{24}/CIM foi o melhor preditor quando C_{max}/CIM estava abaixo de 10. Além disso, em estudo realizado por MACGOWAN e colaboradores (2001) a velocidade de morte bacteriana foi prevista pela C_{max}/CIM , enquanto o efeito total foi previsto pela ASC_{24}/CIM . Portanto, a escolha entre estes dois índices PK/PD permanece sem consenso, além daquele referente ao valor mínimo para ASC_{24}/CIM , que determina que ASC_{24}/CIM de 25 parece ser suficiente para infecções menos severas e ou hospedeiros imunocompetentes, mas $ASC_{24}/CIM \geq 100$ é necessária para infecções severas e/ou hospedeiros imunocomprometidos (JACOBS, 2001).

LISTER (2002a) observou que a razão $ASC_{24}/CIM \geq 30$ para fluorquinolonas pode ser suficiente para a erradicação de pneumococos em modelos de infecção *in vitro*. Para infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*, uma $ASC_{24}/CIM \geq 30$ sugere resultados clínicos favoráveis para a erradicação do microrganismo (RODVOLD & NEUHAUSER, 2001).

AMBROSE e colaboradores (2001) mostraram que, para o gatifloxacino, $ASC_{24}/CIM > 34$ em PAC resultou em probabilidades acentuadas de erradicação microbiológica do *Streptococcus pneumoniae* ($ASC_{24}/CIM \geq 34 = 100\%$ de erradicação; $ASC_{24}/CIM < 34 = 64\%$ de erradicação).

MATTOES e colaboradores (2001) avaliaram a farmacodinâmica do gatifloxacino contra *Streptococcus pneumoniae* e observaram que a ASC_{24}/CIM foi o índice mais preditivo da resposta bacteriana, demonstrando a capacidade da ASC_{24}/CIM como preditor dinâmico da resposta a infecções causadas por pneumococos.

EBISU e colaboradores (2003) avaliaram o efeito dos parâmetros PK/PD do gatifloxacino na sua atividade bactericida e a seleção de resistência contra isolados clínicos de *Streptococcus pneumoniae*. Esses pesquisadores observaram que $ASC_{24}/CIM \geq 36$ e $C_{max}/CIM \geq 1,7$ podem ser possíveis marcadores de erradicação bacteriana e prevenção da emergência de cepas resistentes ao gatifloxacino, respectivamente.

ODENHOLT & CARS (2006) avaliaram o efeito farmacodinâmico do levofloxacino em um modelo *in vitro* empregando o *Streptococcus pneumoniae*. Foi evidenciado que ASC_{24}/CIM de aproximadamente 100 e C_{max}/CIM de 10 foi necessário para atingir o efeito bactericida máximo.

Alguns pesquisadores também sugeriram que o índice PK/PD C_{max}/CIM , variando de 2-10, é necessário para prevenir a seleção de resistência às quinolonas (MADARAS-KELLY & DEMASTERS, 2000; KLEPSEK *et al.*, 2001; LISTER, 2002a).

A seleção apropriada e o uso de um antimicrobiano está baseada nas características da infecção, do hospedeiro e do fármaco. A maioria dos estudos de relações PK/PD de antimicrobianos é essencialmente planejada para explicar como o perfil de concentração versus tempo de um fármaco relaciona-se com a magnitude e o tempo de duração do efeito sobre a bactéria. A interpretação dos índices PK/PD não considera as concentrações flutuantes dos fármacos presentes *in vivo*, uma vez que utiliza a CIM como medida do efeito farmacológico, bem como não avalia a influência da concentração do fármaco no sítio de infecção no hospedeiro, pois trabalha com concentrações plasmáticas, nem seu estado imunológico e a sua capacidade de absorver e de metabolizar os fármacos, limitando-se, apenas, à interação fármaco-bactéria. Desta maneira, os índices PK/PD apresentam limitações como marcadores de eficácia clínica.

Convencionalmente, a dose e a seleção do fármaco na terapia antimicrobiana estão baseadas em um parâmetro farmacodinâmico estático - CIM. Entretanto, as bactérias *in vivo* não estão expostas a concentrações constantes dos antimicrobianos, mas a flutuações que levam a picos e vales, fato que é largamente ignorado pelas determinações estáticas da CIM (DE LA PENÑA *et al.*, 2004). Assim, condições estáticas nas avaliações *in vitro* dificilmente refletirão uma situação dinâmica em um órgão alvo sobre condições *in vivo* (DELACHER *et al.*, 2000).

A relevância da CIM como marcador de efeito para situações *in vivo*, deste modo, tem sido questionada. As condições padronizadas do teste (tamanho do inóculo definido, meio de crescimento artificial e concentrações estáticas) são verdadeiramente diferentes daquelas esperadas no sítio de infecção. Apesar disso, evidências clínicas e experimentais relatadas na literatura continuam a reforçar a correlação entre a CIM e o efeito (SCHENTAG, 1991; CRAIG, 1993; KNUDSEN *et al.*, 1995; PRESTON *et al.*, 1998).

A CIM assume um papel fundamental quando é usada para correlacionar parâmetros farmacocinéticos com a potência, isto é, para calcular os índices PK/PD. É importante considerar que a CIM, entretanto, não representa um valor absoluto. A “verdadeira” CIM está num ponto entre a menor concentração do teste que inibe o crescimento do microrganismo (ou seja, a leitura da CIM) e a próxima menor concentração do teste. A CIM tem sido determinada usando concentrações derivadas, tradicionalmente, de diluições 2x em série indexadas à base 1 (ex., 1, 2, 4, 8, 16 µg/mL, etc.). Assim, o erro de diluição inerente é um passo de diluição nesta direção (CLSI, 2003). Evidentemente, esta imprecisão pode ter uma profunda influência para os índices PK/PD calculados (FRIDMODT-MOLLER, 2002). Apesar disso, alguns autores sugerem que uma melhor predição do efeito, baseado nos parâmetros farmacocinéticos, possa ser obtida se esses estiverem correlacionados com a CIM da cepa infectante (DRUSANO *et al.*, 1984, LEGGETT *et al.*, 1989, SCHENTAG *et al.*, 1991, PRESTON *et al.*, 1998).

Além dos problemas relativos ao uso da CIM, a relação ASC_{24}/CIM pode gerar previsões não fidedignas dos resultados clínicos, pois diversos regimes posológicos podem gerar a mesma ASC, não significando que serão igualmente efetivos *in vivo*. Assumindo-se farmacocinética linear, se a dose diária total de um fármaco for administrada em uma ou duas tomadas ao dia, a ASC será a mesma, mas o efeito

sobre a morte bacteriana, concentração dependente, não será o mesmo, visto que a exposição do microrganismo ao fármaco será diferente. Conseqüentemente, a utilização dos índices PK/PD tem poder limitado para otimizar terapias. Informações com maior poder de previsão serão obtidas quando estes parâmetros estiverem inseridos em um modelo farmacocinético-farmacodinâmico que consiga descrever as flutuações das concentrações na biofase em função do tempo e o efeito bactericida advindo das mesmas.

Modelos PK/PD baseados nas concentrações livres dos antimicrobianos no sítio de ação, que podem ser determinadas por microdiálise, e as curvas de morte/crescimento bacteriano podem ter maior potencial de previsão da eficácia clínica de diferentes posologias antimicrobianas do que os índices PK/PD baseados na CIM. A modelagem PK/PD fornece parâmetros adicionais resultantes da avaliação temporal simultânea de concentração e efeito, que possibilitam a comparação da potência e da atividade intrínseca de diferentes antimicrobianos frente à mesma bactéria, o que não pode ser obtido com a utilização dos índices (RODVOLD *et al.*, 2001; NIGHTINGALE & MURAKAWA, 2002).

2.2. Microdiálise

No passado, a avaliação farmacocinética e farmacodinâmica dos antimicrobianos foi baseada principalmente nas medidas das concentrações plasmáticas ou séricas. Atualmente, no entanto, maior atenção tem sido dada à determinação das concentrações teciduais, pois a maioria das infecções ocorre nos tecidos. A maioria dos patógenos é extracelular e apenas a concentração livre do antimicrobiano é responsável pela atividade bactericida, sendo essa mais relevante para predizer a eficácia terapêutica do que as concentrações plasmáticas totais (LIU & DERENDORF, 2003). Neste sentido, as autoridades regulatórias como FDA (*Food and Drug Administration*) e EMEA (*European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*) têm reconhecido que as concentrações plasmáticas de agentes antimicrobianos são pouco relevantes e que as concentrações teciduais destes são muito mais importantes para a predição da eficácia clínica e microbiológica (ZEITLINGER *et al.*, 2005).

A diferença entre as concentrações plasmáticas totais e as concentrações livres teciduais pode ser significativa em muitas situações, tais como aquelas em que a ligação a proteínas plasmáticas é alta e não linear. A penetração e o metabolismo tecidual também podem afetar os perfis farmacocinéticos dos antimicrobianos nos tecidos. Ainda, o uso de concentrações plasmáticas totais para relacionar com o efeito antibacteriano pode superestimar os reais níveis do antimicrobiano no tecido, onde os níveis sub-inibitórios no sítio de infecção constituem uma das maiores causas para a emergência de resistência. Portanto, as concentrações plasmáticas totais não representam valores farmacocinéticos ideais para a dosificação de antimicrobianos, e as concentrações livres dos mesmos nos sítios de infecção devem ser consideradas (LIU & DERENDORF, 2003).

A microdiálise (MD) é uma ferramenta que permite monitorar as concentrações livres locais de fármacos e seus metabólitos em tecidos específicos do organismo (LANGE *et al.*, 2000), que podem ser diferentes daquelas da circulação sistêmica e, possivelmente, mais representativas do sítio de ação dos fármacos (ELMQUIST & SAWCHUK, 2000; JOUKRADAR *et al.*, 2001a).

A MD *in vivo* tem sido extensivamente empregada para estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos (ELMQUIST & SAWCHUK, 2000). O princípio da MD se baseia na amostragem de analitos em diferentes locais do organismo por meio de uma membrana semipermeável colocada na extremidade de uma sonda de MD, a qual é constantemente perfundida, a um fluxo constante, com um líquido que simule o meio intersticial. Uma vez que a sonda está implantada no tecido, as substâncias presentes no fluido extracelular (C_{tecidual}) passam para o interior da sonda (Figura 2), sendo coletadas por difusão simples, resultando na concentração do dialisado ($C_{\text{dialisado}}$). As amostras são coletadas e analisadas posteriormente por método analítico adequado, possibilitando determinar parâmetros farmacocinéticos para tecidos específicos (JOUKRADAR *et al.*, 2001a).

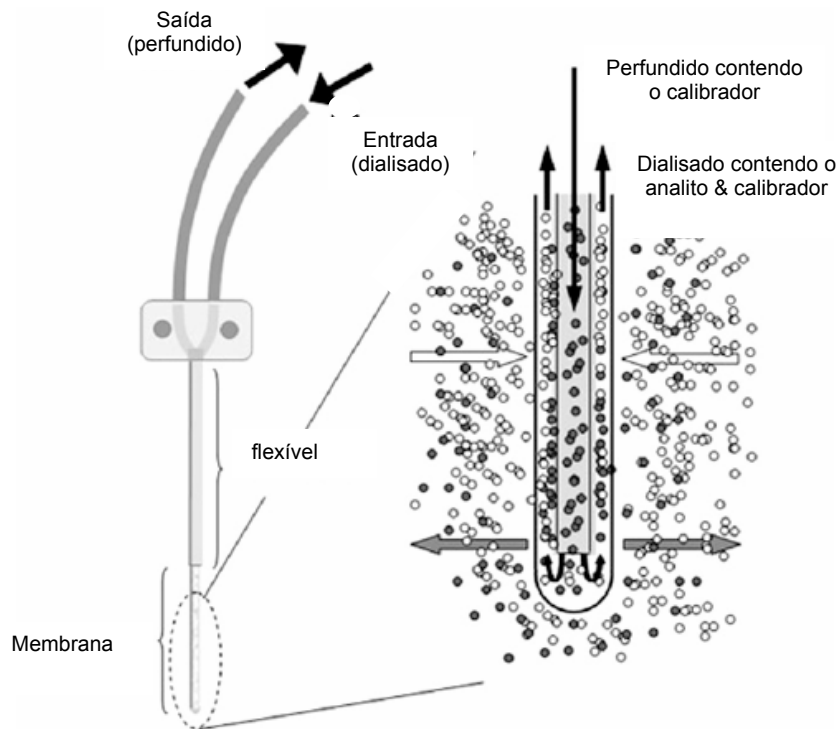


Figura 2. Representação esquemática de uma sonda de microdiálise inserida em tecido. A sonda de microdiálise implantada é perfundida com o fluido de perfusão similar em composição ao líquido intersticial e as substâncias presentes no espaço intersticial do sítio investigado podem difundir para dentro da sonda, através de uma membrana semipermeável, e aparecer no dialisado (Adaptado de CHAURASIA *et al.*, 2007).

Apenas a fração livre do analito presente no fluido ou tecido de amostragem sofrerá o processo de difusão através da membrana, uma vez que as substâncias ligadas às proteínas não difundem através da membrana, devido ao *cut off* da mesma. Conseqüentemente, apenas substâncias de baixo peso molecular e solúveis nos fluidos do espaço intersticial poderão ser coletadas pela técnica de MD (JOHANSEN *et al.*, 1997; PETERS *et al.*, 2000; MÜLLER, 2002).

Como resultado da perfusão contínua da sonda, não ocorre equilíbrio entre a concentração do analito no tecido amostrado e no dialisado. Conseqüentemente, a concentração do analito no tecido será maior do que aquela presente no dialisado. Portanto, para se obter a real concentração tecidual, é necessário conhecer o fator que inter-relaciona estas concentrações. Este fator é obtido mediante experimentos de recuperação das sondas, motivo pelo qual elas precisam ser calibradas (LÖNNROTH *et al.*, 1987; LANGE *et al.*, 2000; STAHL *et al.*, 2002).

Inicialmente a MD foi planejada para medir as concentrações de neurotransmissores no cérebro de ratos, sendo gradualmente adotada em outras áreas de pesquisa (UNGERSTEDT, 1991). A primeira aplicação publicada sobre a MD em humanos foi um estudo sobre as concentrações intersticiais de glicose (LÖNNROTH *et al.*, 1987), sendo seu uso inicialmente confinado ao tecido adiposo (LÖNNROTH *et al.*, 1987; BOLINDER *et al.*, 1993). No entanto, vários outros órgãos e tecidos humanos foram sendo contemplados com estudos de MD, como o cérebro (DURING & SPENCER, 1993; SCHEYER *et al.*, 1994), o coração (KENNENGREN *et al.*, 1999), os tumores sólidos (MÜLLER *et al.*, 1997a), o músculo esquelético (JOUKHADAR *et al.*, 2002), e o pulmão (HERKNER *et al.*, 2002), entre outros.

O primeiro estudo que empregou a MD pulmonar foi publicado em 1991 e investigou a farmacocinética da teofilina em ratos (LARSSON, 1991). A maioria dos estudos de MD pulmonar, no entanto, tem sido conduzida para a determinação dos perfis de agentes antimicrobianos. Mesmo assim, há poucos relatos da utilização da MD pulmonar e apenas informações limitadas da farmacocinética de agentes antimicrobianos neste tecido estão disponíveis. Alguns estudos de MD pulmonar em ratos descritos na literatura compreendem: tobramicina e gentamicina (EISENBERG *et al.*, 1993), cefaclor (DE LA PEÑA *et al.*, 2001), cefpodoxima (LIU *et al.*, 2002), piperacilina+tazobactam (TOMASELLI *et al.*, 2003) e imipenem (MARCHAND *et al.*, 2005).

Diferentes grupos de pesquisadores têm conduzido estudos utilizando a MD para monitorar a farmacocinética de vários antimicrobianos em humanos, como pode ser visualizada na Tabela 2.

Tabela 2. Antimicrobianos avaliados por microdiálise em humanos em diferentes biofases.

Biofase	Fármaco	Fonte
	piperacilina	BRUNNER <i>et al.</i> , 2000
	cefixima e cefpodoxima	LIU <i>et al.</i> , 2002
Músculo Esquelético	cefpiroma	JOUKHADAR <i>et al.</i> , 2002
	cefaclor	DE LA PEÑA <i>et al.</i> , 2002

	fosfomicina	JOUKHADAR <i>et al.</i> , 2003
	levofloxacino	ZEITLINGER <i>et al.</i> , 2003
Músculo Esquelético e Tecido Adiposo Subcutâneo	floxacinona, fenoximetilpenicilina e eritromicina	MÜLLER <i>et al.</i> , 1996
	cefodizima e cefpiroma	MÜLLER <i>et al.</i> , 1997b
	ciprofloxacino	BRUNNER <i>et al.</i> , 1999
	moxifloxacino	MÜLLER <i>et al.</i> , 1999
	fosfomicina	FROSSARD <i>et al.</i> , 2000
	piperacilina	JOUKHADAR <i>et al.</i> , 2001b
Tecido Adiposo Subcutâneo	gentamicina	LORENTZEN <i>et al.</i> , 1996
	fosfomicina	LEGAT <i>et al.</i> , 2003
	levofloxacino	BELLMANN <i>et al.</i> , 2004
Músculo Esquelético e Pulmão	piperacilina	TOMASELLI <i>et al.</i> , 2003
	meropenem	TOMASELLI <i>et al.</i> , 2004
Pulmão	cefpiroma	HERKNER <i>et al.</i> , 2002
	imipenem	TEGEDER <i>et al.</i> , 2002
	levofloxacino	HUTSCHALA <i>et al.</i> , 2005

Várias comparações entre antimicrobianos podem ser feitas com os dados obtidos mediante o emprego da MD: comparação da MD com outras técnicas utilizadas para avaliar a penetração tecidual de fármacos; comparação da penetração de fármacos em diferentes tecidos no mesmo indivíduo; e a comparação da penetração do mesmo fármaco em animais e humanos. A descrição de alguns destes estudos encontrados na literatura considerando estas comparações é apresentada a seguir.

EISENBERG e colaboradores (1993) utilizaram a técnica de MD em ratos para medidas farmacocinéticas intrabrônquicas *in vivo* de dois aminoglicosídeos – tobramicina e gentamicina. Os perfis de concentração versus tempo dos antimicrobianos no fluido epitelial pulmonar (ELF), seguindo administração intravenosa *bolus*, e suas razões de penetração foram determinadas e comparadas com os resultados obtidos por VALCKE e colaboradores (1990) para os mesmos antimicrobianos, utilizando a técnica de lavagem broncoalveolar (BAL). A penetração média da tobramicina e da gentamicina indicada pela $ASC_{\text{tecidual}}/ASC_{\text{plasmática}}$ foi 0,36 e

0,56 (MD) e 0,45 e 0,67 (BAL), respectivamente. Os resultados similares obtidos por ambos os métodos podem ser atribuídos ao fato dos aminoglicosídeos distribuírem-se extensivamente no fluido do espaço extracelular, sugerindo que a MD pode ser utilizada para medidas farmacocinéticas intrabrônquicas de fármacos, como uma extensão da técnica de lavagem broncoalveolar ou como uma alternativa a esta.

Embora a BAL possa ser empregada para a determinação das concentrações intrabrônquicas de fármacos, esta técnica apresenta algumas limitações gerais, especialmente a pobre resolução anatômica e a capacidade de discriminar entre concentração livre e ligada (ZEITLINGER *et al.*, 2005). A MD, por sua vez, supera tais limitações, podendo ser empregada na determinação de concentrações locais, em sítios específicos, bem como permite a determinação das concentrações livres (ativas) dos fármacos, representando uma alternativa vantajosa àquela.

A quantidade de fármaco que chega a cada tecido do organismo e a afinidade deste por cada tecido podem ser diferentes, gerando concentrações teciduais totais distintas. A teoria dos ligantes livres proposta por DEGUCHI e colaboradores (1992) considera que as concentrações livres do fármaco, em qualquer tecido, encontram-se em equilíbrio com as concentrações livres plasmáticas. Desta maneira, quando a difusão é o único processo pelo qual ocorre a distribuição do fármaco, as concentrações livres determinadas em diferentes tecidos devem ser semelhantes, mesmo com concentrações teciduais totais distintas. Esta teoria foi proposta para antimicrobianos β -lactâmicos, mas pode ser extrapolada para outras classes, sendo, portanto, a determinação da fração livre em diferentes tecidos importante para elucidar/confirmar a teoria proposta. Na medida em que for confirmada a semelhança, a amostragem da fração livre poderá ser feita em tecidos mais acessíveis do organismo, visto representar as concentrações livres em qualquer biofase.

A maioria das infecções pulmonares bacterianas está localizada nos fluidos do espaço intersticial, local importante para a terapia antimicrobiana. DE LA PEÑA e colaboradores (2001) compararam a penetração do cefaclor, uma cefalosporina de amplo espectro, no espaço intersticial pulmonar e no músculo esquelético de ratos, com os níveis plasmáticos totais. As concentrações intersticiais livres no músculo e no pulmão foram medidas por MD seguindo doses i.v. *bolus* de cefaclor de 50 ou 75 mg/kg. Os autores observaram que as concentrações livres de cefaclor no espaço intersticial do

pulmão e no músculo esquelético foram de magnitude similar e menores do que aquelas previstas com os dados plasmáticos. O fator de proporcionalidade entre a previsão dos dados teciduais e os valores medidos foi de $0,25 \pm 0,09$ para pulmão e de $0,27 \pm 0,08$ para músculo (Figura 3). Novamente, a utilização das concentrações plasmáticas totais superestimaria a atividade antibacteriana do fármaco e, portanto, sua eficácia clínica, devendo-se utilizar os níveis terapeuticamente ativos do cefaclor no sítio de ação.

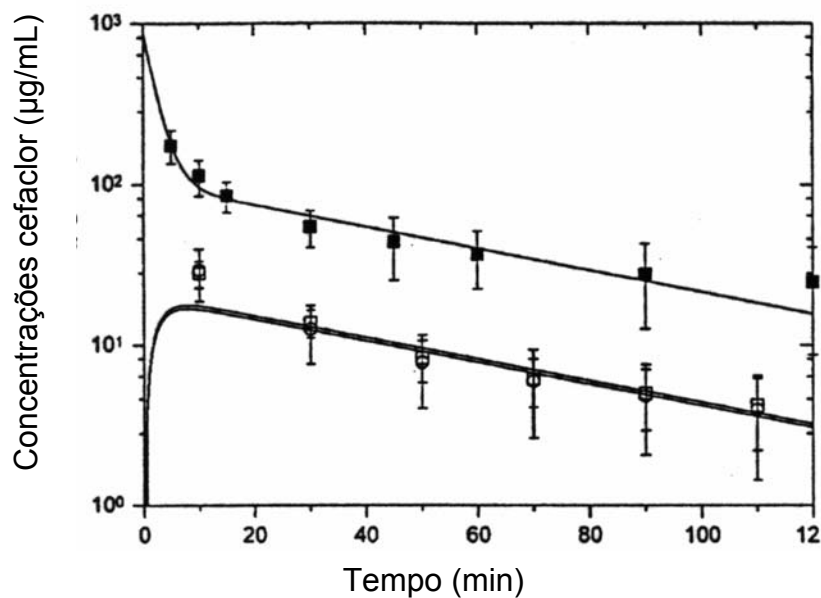


Figura 3. Concentrações plasmáticas médias (\pm desvios padrões) do cefaclor (■) e concentrações livres médias (\pm desvios padrões) no músculo (□) e pulmão (○) seguindo administração intravenosa *bolus* de 50 mg/kg. As linhas representam o ajuste simultâneo dos níveis plasmáticos e teciduais utilizando abordagem compartimental (n = 7) (Adaptado de DE LA PENÑA *et al.*, 2001).

LIU e colaboradores (2002) avaliaram a penetração intersticial de cefpodoxima, através de MD, em ratos Wistar. As concentrações plasmáticas totais, livres no músculo e livres no pulmão, foram determinadas após a administração intravenosa de 10 mg/kg ou 20 mg/kg de cefpodoxima por 5 horas ou uma infusão intravenosa contínua de 260 µg/h após uma dose de ataque de 6 mg/kg. Os autores observaram que as concentrações livres musculares do fármaco foram similares às concentrações livres pulmonares, fornecendo uma medida da cefpodoxima no sítio alvo pulmonar, contudo menores que as concentrações plasmáticas totais (Figura 4). As previsões da eficácia

antibacteriana baseadas nas concentrações plasmáticas totais de cefpodoxima poderiam superestimar as concentrações no sítio alvo e, possivelmente, a eficácia clínica.

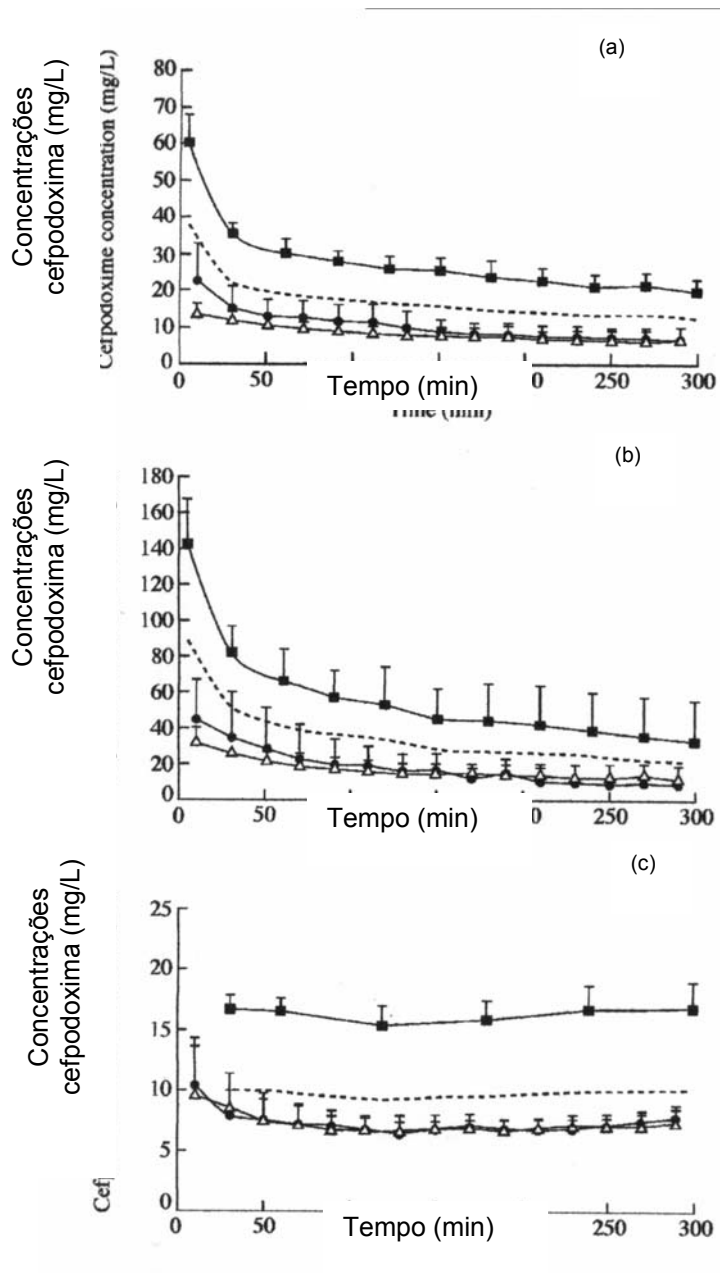


Figura 4. Concentrações plasmáticas totais (■), livres pulmonares (●), livres musculares (Δ), ambas determinadas por microdialíse, e plasmáticas livres calculadas (- - -) de cefpodoxima em ratos Wistar machos, seguindo administração de uma dose intravenosa de (a) 10 mg/kg de cefpodoxima (n = 6) ou (b) 20 mg/kg de cefpodoxima (n = 6), ou (c) *steady-state* durante infusão contínua de 260 µg/h após uma dose de ataque de 6 mg/kg de cefpodoxima (n = 6). Valores são médias + desvios padrões (Adaptado de LIU *et al.*, 2002).

MARCHAND e colaboradores (2005) avaliaram a distribuição do imipenem no músculo e nos fluidos extracelulares pulmonares de ratos saudáveis, mediante o emprego da MD, com a finalidade de comparar as concentrações livres teciduais com as concentrações livres plasmáticas. Foi administrada uma dose de 120 mg/kg do fármaco por um período de 30 minutos, sendo as amostras coletadas por um período de 150 minutos, variando-se os intervalos de coleta no decorrer do experimento. Em ratos hidratados, os parâmetros C_{max} , ASC e $t_{1/2}$ não diferiram estatisticamente entre músculo, pulmão e sangue, bem como não diferiram também a $ASC_{tecidual}/ASC_{plasmática}$ para músculo e pulmão. Portanto, através deste estudo foi possível demonstrar que as concentrações livres do imipenem foram virtualmente idênticas entre sangue, músculo e pulmão, confirmando a teoria proposta por DEGUCHI e colaboradores (Figura 5).

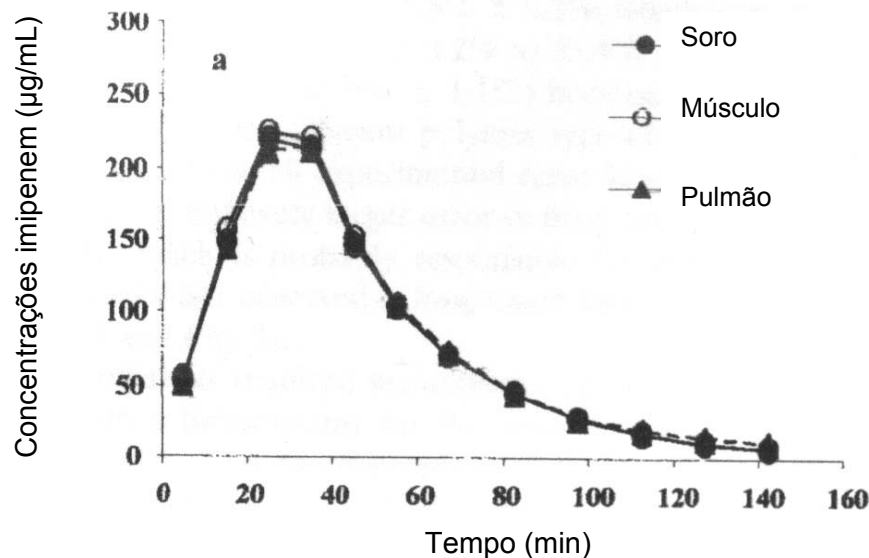


Figura 5. Perfis de concentrações livres versus tempo para o imipenem em pulmão, músculo esquelético sadio e soro de ratos ($n = 6$), após a infusão intravenosa de 120 mg/kg por 30 minutos do imipenem (Adaptado de MARCHAND *et al.*, 2005).

TOMASELLI e colaboradores (2003) utilizaram a técnica de MD para determinar a penetração da combinação piperacilina-tazobactam (4 g – 0,5 g, respectivamente) em pacientes acometidos por pneumonia e enfisema pleural metapneumônico. As sondas de MD foram inseridas no tecido pulmonar pneumônico e no músculo esquelético sadio por período de 8 horas, sendo as amostras coletadas a cada 20 minutos. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a ASC pulmonar e sérica ($P = 0,018$), bem como entre a ASC pulmonar e muscular ($P = 0,043$), com maior penetração

pulmonar. As concentrações intrapulmonares de piperacilina e tazobactam excederam a concentração inibitória mínima para a maioria das bactérias mais relevantes por 4-6 horas, sendo o procedimento bem tolerado pelos pacientes. Entretanto, para microrganismos menos sensíveis como *Pseudomonas aeruginosa*, o $t > \text{CIM}$ foi de no máximo 2,5 horas, o que pode ter ocasionado a falência terapêutica relatada, pois concentrações insuficientes do antimicrobiano podem ter levado ao desenvolvimento de resistência à piperacilina e, conseqüentemente, ao fracasso na erradicação da bactéria.

TOMASELLI e colaboradores (2004) determinaram, através de MD, a penetração do meropenem no fluido do espaço extracelular do parênquima pulmonar pneumônico humano. A penetração pulmonar do meropenem foi determinada em sete pacientes com pneumonia e enfisema pleural metapneumônico. Neste experimento, duas sondas de MD foram inseridas no tecido pulmonar pneumônico e uma sonda no músculo esquelético sadio. Amostras de soro e microdialisado foram coletadas a intervalos de 20 minutos por 8 horas após a administração de 1 g de meropenem administrado intravenosamente. O meropenem penetrou rapidamente no tecido pulmonar infectado, alcançando concentrações máximas no fluido intersticial pulmonar de $11,4 \pm 10,9$ mg/L. Houve diferença estatisticamente significativa entre as ASCs no fluido pulmonar e soro ($P = 0,018$), mas não entre as ASCs no tecido muscular e no soro (Figura 6). Os autores não conseguiram explicar o padrão de distribuição tecidual observado e sugeriram que novos estudos fossem realizados para investigar o meropenem.

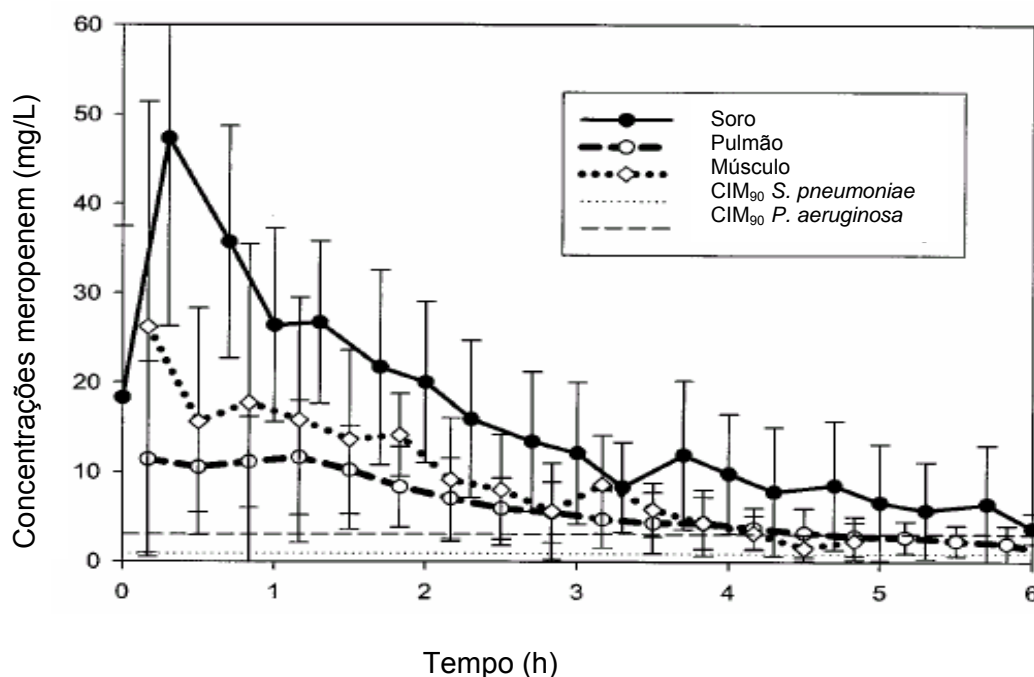


Figura 6. Perfis de concentração versus tempo para o meropenem em fluido intersticial de pulmão infectado, músculo esquelético sadio, e soro após a quinta administração de 1 grama de meropenem em infusão de 20 minutos (Adaptado de TOMASELLI *et al.*, 2004).

HUTSCHALA e colaboradores (2005) avaliaram a penetração pulmonar do levofloxacino em pacientes ($n = 6$) após cirurgia cardíaca, quando foi administrada uma dose de 500 mg do fármaco intravenosamente. As concentrações livres pulmonares do levofloxacino foram determinadas empregando a técnica de MD. Os autores observaram que o levofloxacino, quando administrado na dose de 500 mg, não gerou concentrações pulmonares suficientes para ser efetivo contra todas as cepas de *Klebsiella pneumoniae* investigadas. Além disso, a CIM₉₀ do levofloxacino para *Pseudomonas aeruginosa* não foi alcançada, o que aponta para a necessidade de se aumentar a dose para 750 mg, que é a dose máxima recomendada. Porém, as concentrações determinadas para o levofloxacino no pulmão podem ter sido influenciadas pelas mudanças na macro e na microcirculação, aumento do volume de distribuição e no extravasamento capilar durante o procedimento cirúrgico.

DE LA PENÃ e colaboradores (2002) determinaram as concentrações livres plasmáticas e as concentrações livres do cefaclor em tecido muscular humano (Figura 7), após a administração de cefaclor em diferentes doses (500 ou 750 mg). Os autores obtiveram neste estudo a mesma proporcionalidade entre as concentrações livres plasmáticas e musculares do fármaco observada para músculo e pulmão em ratos (DE

LA PEÑA *et al.*, 2001), com um fator de penetração tecidual de aproximadamente 0,26, independente da dose e do tecido considerado. Conseqüentemente, inferiram que as concentrações livres pulmonares do cefaclor em humanos seriam semelhantes às concentrações livres musculares determinadas experimentalmente, por semelhança com os resultados obtidos em roedores. Assim, os autores sugeriram que as concentrações no músculo esquelético poderiam ser preditoras razoáveis das concentrações do cefaclor em pulmão de humanos.

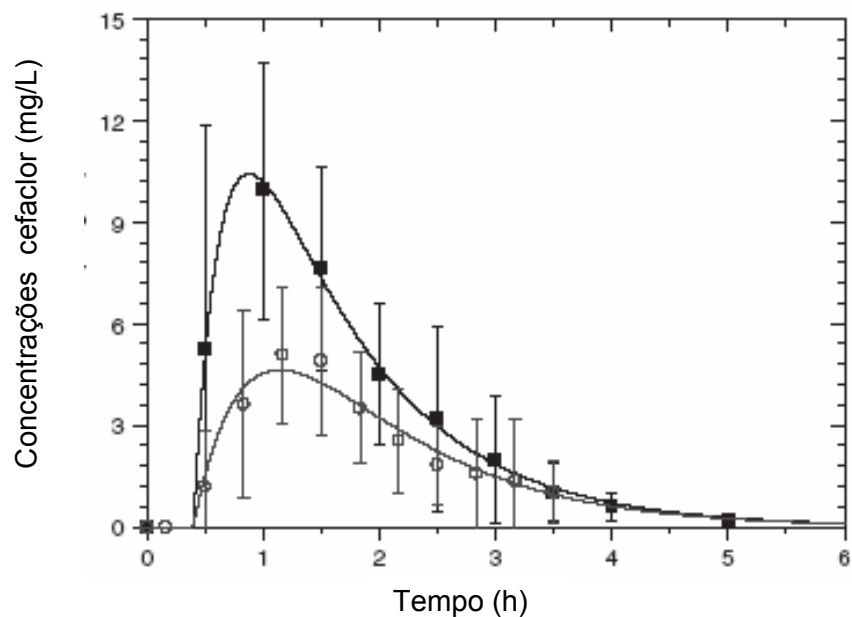


Figura 7. Concentrações médias (\pm DP) plasmáticas (■) do cefaclor juntamente com as concentrações livres musculares (○) do cefaclor após a administração de 500 mg como forma farmacêutica sólida de liberação imediata. As linhas representam os ajustes das curvas mediante o emprego da abordagem compartimental dos dados.

A mesma abordagem utilizada por DE LA PEÑA e colaboradores é proposta neste trabalho, onde primeiramente serão determinados os níveis de gatifloxacino no tecido pulmonar e muscular de ratos. Assumindo-se que a mesma proporcionalidade existe entre os níveis plasmáticos livres e pulmonares em roedores e humanos, dados de farmacocinética plasmática em humanos do gatifloxacino relatados na literatura serão utilizados para calcular as concentrações livres plasmáticas que serão simuladas *in vitro*, na construção do modelo PK/PD.

2.3. Modelagem PK/PD de Antimicrobianos

Modelos são usados tipicamente para ajudar a fornecer uma descrição simplificada das observações em um experimento e possivelmente fazer previsões para experimentos futuros. Tradicionalmente, os modelos farmacodinâmicos relacionam as concentrações no sítio de efeito com a resposta farmacológica (LALONDE, 1992). Considerando que para a farmacocinética a descrição da concentração do fármaco no organismo é obtida em função do tempo e que os modelos PK/PD relacionam estas duas áreas, o ponto de intersecção entre elas é justamente a concentração, fundamental para a relação efeito-tempo a ser descrita na modelagem PK/PD. Portanto, a modelagem PK/PD pode ser definida como a descrição matemática que permite descrever e prever a variação do efeito com a variação da concentração do fármaco no organismo, em função do tempo (DERENDORF & HOCHHAUS, 1995).

Quando um efeito farmacológico é observado rapidamente após a administração do fármaco e está diretamente relacionado com as concentrações deste, os modelos farmacodinâmicos linear, de efeito máximo (E_{max}) e de efeito máximo sigmoidal (E_{max} - sigmoidal) podem ser aplicados para descrever a relação entre a concentração e o efeito (MOUTON *et al.*, 1997), sendo os dois últimos os mais utilizados (DERENDORF & MEIBOHM, 1999).

O modelo E_{max} descreve uma típica relação hiperbólica de concentração-efeito, onde não se observa efeito quando da ausência de fármaco e um efeito máximo é observado quando as concentrações aproximam-se do infinito (Equação 1). O modelo de E_{max} -sigmoidal, que é uma extensão do primeiro, é utilizado quando a curva concentração-efeito não pode ser descrita de forma hiperbólica simples (LALONDE, 1992), Equação 2:

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

$$E = \frac{E_{max} \cdot C^s}{EC_{50}^s + C^s} \quad (2)$$

onde E é o efeito farmacológico do fármaco; E_{max} é o efeito farmacológico máximo obtido pelo fármaco; C é a concentração do fármaco; EC_{50} é a concentração onde 50% do efeito máximo é medido, 's' é o fator de Hill (coeficiente de sigmoidicidade), parâmetro que determina a forma sigmoidal da relação efeito-concentração (MOUTON *et al.*, 2005). A potência do fármaco em um sistema pode ser caracterizada pelo EC_{50} ; enquanto que a eficácia, ou seja, o máximo de resposta, é representado pelo E_{max} (MEIBOHM & DERENDORF, 1997).

O expoente 's', teoricamente, reflete o número de moléculas do fármaco que se liga a cada molécula do receptor. Se 's' for igual a um, o modelo E_{max} resultará em uma função hiperbólica simples; se for diferente de um, será sigmoidal (LALONDE, 1992; DERENDORF & HOCHHAUS, 1995).

NOLTING e colaboradores (1996) modificaram o modelo E_{max} com a finalidade de avaliar, em modelo de infecção experimental *in vitro*, o efeito bactericida da piperacilina sobre a *Escherichia coli*, utilizando simulações do perfil de concentração tecidual livre esperado em tecido muscular de humanos após a 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 (Equação 3):

$$\frac{dN}{dt} = K \cdot N \quad (3)$$

Entretanto, quando o antimicrobiano é inserido no sistema, sua concentração passa a influenciar negativamente a constante de geração bacteriana, sendo que o efeito do antimicrobiano pode ser determinado através da Equação 4 (NOLTING *et al.*, 1996):

$$\frac{dN}{dt} = \left(K - \frac{K_{max} \cdot C}{EC_{50} + C} \right) \cdot N \quad (4)$$

onde dN/dt é a variação do número de bactérias em função do tempo; K é a constante de velocidade de geração bacteriana na ausência do antimicrobiano; k_{max} é a constante de velocidade de morte bacteriana máxima na presença do antimicrobiano; C é a concentração livre do antimicrobiano no tecido infectado no tempo t ; EC_{50} é a concentração necessária onde 50% do efeito máximo é medido e N é o número de bactérias no inóculo inicial. Nesta equação, C é substituído pela equação farmacocinética compartimental que descreve o perfil de concentração livre 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.

A utilização do modelo modificado por NOLTING e colaboradores (1996) permitiu descrever o perfil bactericida da piperacilina frente a *Escherichia coli* quando diferentes doses foram simuladas no modelo de infecção *in vitro*, estando o microrganismo exposto tanto a concentrações constantes do fármaco (1-32 $\mu\text{g/mL}$), simulando infusão contínua, como flutuantes (picos entre 50 e 200 $\mu\text{g/mL}$), após a administração de doses de 1-8 g, com intervalos entre as mesmas de 4-24 h. O experimento demonstrou que apenas em concentrações superiores a 8 $\mu\text{g/mL}$ foi possível observar a redução no número de bactérias. Na Figura 8 pode ser observado o efeito obtido pela piperacilina, quando concentrações flutuantes do fármaco foram simuladas.

Nos painéis A e B da Figura 8, observa-se que o recrescimento bacteriano no sistema, na presença de fármaco, ocorreu em taxa bastante semelhante ao controle (sem fármaco) quando o intervalo entre as doses foi de 24 horas. Nos painéis C e D, onde o intervalo entre as doses foi de 8 horas, entretanto, o efeito mostrou-se dependente da concentração inicial do fármaco, com decaimento da população bacteriana quando a dose de 100 $\mu\text{g/mL}$ foi utilizada. Nos painéis E e F, com intervalo entre doses de 4 horas, ambas as concentrações iniciais de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ induziram a morte bacteriana. Assim, os resultados deste estudo demonstraram a importância de se utilizar intervalos reduzidos de doses para a administração deste antimicrobiano β -lactâmico. Os resultados também mostraram que o modelo E_{max} modificado descreveu adequadamente as curvas de morte/recrescimento bacteriano para as diferentes posologias investigadas, determinando-se $k = 2,8 \text{ h}^{-1}$, $k_{max} = 6,4 \text{ h}^{-1}$ e $EC_{50} = 5 \mu\text{g/mL}$ (painel A); $k = 2,06 \text{ h}^{-1}$, $k_{max} = 4,63 \text{ h}^{-1}$ e $EC_{50} = 5,24 \mu\text{g/mL}$ (painel B); $k = 1,23 \text{ h}^{-1}$, $k_{max} = 2,1 \text{ h}^{-1}$ e $EC_{50} = 6,4 \mu\text{g/mL}$ (painel C); $k = 0,98 \text{ h}^{-1}$, $k_{max} = 2,42 \text{ h}^{-1}$ e $EC_{50} = 5,4 \mu\text{g/mL}$

(painel D); $k = 1,41 \text{ h}^{-1}$, $k_{\max} = 4,22 \text{ h}^{-1}$ e $EC_{50} = 8,24 \mu\text{g/mL}$ (painel E); $k = 2,49 \text{ h}^{-1}$, $k_{\max} = 5,1 \text{ h}^{-1}$ e $EC_{50} = 4,71 \mu\text{g/mL}$ (painel F).

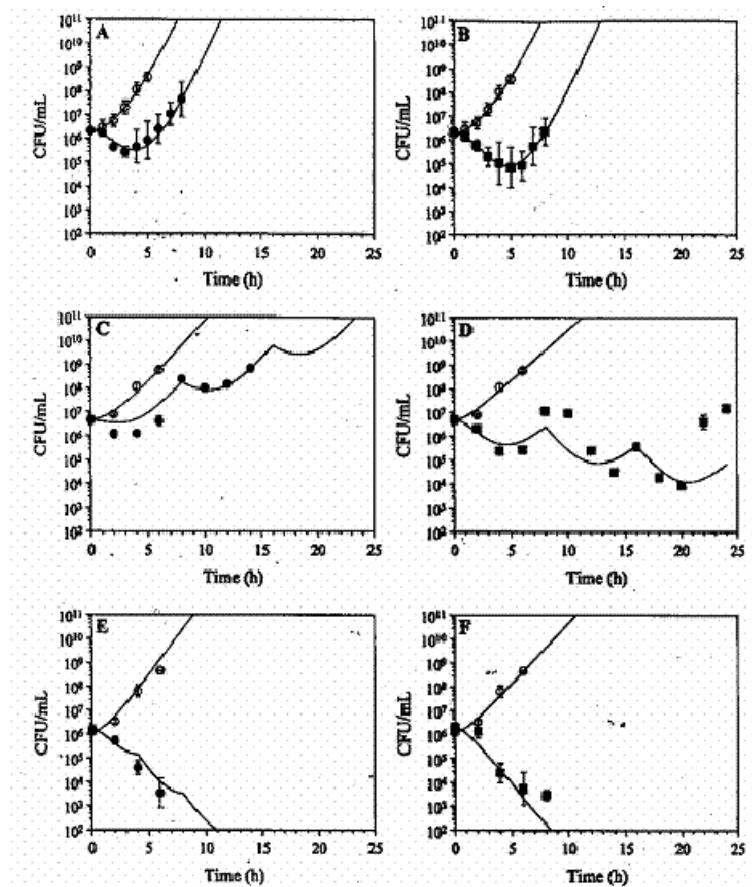


Figura 8. Curva de efeito antibacteriano da piperacilina para concentrações de pico de $50 \mu\text{g/mL}$ (●) e $100 \mu\text{g/mL}$ (■) comparadas com o controle sem fármaco (○). A. $50 \mu\text{g/mL}$ q24h; B. $100 \mu\text{g/mL}$ q24h; C. $50 \mu\text{g/mL}$ q8h; D. $100 \mu\text{g/mL}$ q8h; E. $50 \mu\text{g/mL}$ q4h; F. $100 \mu\text{g/mL}$ q4h (Retirado de NOLTING *et al.*, 1996).

DELACHER e colaboradores (2000) utilizaram o mesmo modelo PK/PD para a previsão do efeito bactericida do ciprofloxacino quando diferentes isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram expostos *in vitro* a concentrações livres de ciprofloxacino equivalentes àquelas que seriam obtidas no espaço intersticial do tecido subcutâneo de indivíduos saudáveis, após a administração de dose única i.v. de 200 mg. Experimentos similares foram conduzidos, mediante a simulação dos perfis livres teciduais esperados para as doses de 400 e 800 mg, com a finalidade de avaliar a capacidade de previsão do modelo. Os parâmetros gerados pelo modelo foram $k = 0,0072 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$; $k_{\max} = 0,309 \pm 0,132 \text{ min}^{-1}$ e $EC_{50} = 3,2 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$. As simulações *in vitro* levaram a uma diminuição média no número de microrganismos

viáveis de 1-3 \log_{10} após 8 horas. Um dos principais resultados observados pelos autores foi que a variabilidade interindividual observada para a farmacocinética *in vivo* no sítio alvo correspondeu à variabilidade no perfil farmacodinâmico *in vitro*. Dados farmacodinâmicos individuais, entretanto, foram intimamente correlacionados com os parâmetros farmacocinéticos, tais como a ASC. Assim, parece que a variabilidade farmacocinética e, particularmente a variabilidade na cinética de distribuição, é o fator chave na determinação da variabilidade farmacodinâmica do ciprofloxacino. A abordagem PK/PD utilizada permitiu a análise mais detalhada dos dados que o método baseado na CIM. Os autores concluíram que a abordagem PK/PD utilizada no estudo pode fornecer informações valiosas para a seleção de doses deste agente antimicrobiano.

DE LA PENÃ e colaboradores (2004) também empregaram o modelo PK/PD descrito anteriormente para estudar o efeito do cefaclor contra diferentes cepas bacterianas. Estas foram expostas *in vitro* às concentrações intersticiais do cefaclor, obtidas em humanos, após a administração de 500 e 750 mg em formulações de liberação imediata ou modificada. O modelo utilizado permitiu acompanhar a morte das bactérias e as curvas de recrescimento como função direta do perfil farmacocinético no sítio de ação bacteriana. Os parâmetros gerados pelo modelo foram $k = 2 \text{ h}^{-1}$; $k_{\text{max}} = 6,1 \pm 0,2 \text{ h}^{-1}$ e $\text{EC}_{50} = 3,5 \pm 0,7 \text{ } \mu\text{g/mL}$ para *Escherichia coli*; $k = 0,8 \text{ h}^{-1}$; $k_{\text{max}} = 2,6 \pm 0,3 \text{ h}^{-1}$ e $\text{EC}_{50} = 0,5 \pm 0,6 \text{ } \mu\text{g/mL}$ para *Moraxella catarrhalis*, $k = 1 \text{ h}^{-1}$; $k_{\text{max}} = 1,5 \pm 0,2 \text{ h}^{-1}$ e $\text{EC}_{50} = 2,4 \pm 1,4 \text{ } \mu\text{g/mL}$ para *Haemophilus influenzae* e $k = 1,6 \text{ h}^{-1}$; $k_{\text{max}} = 2,5 \pm 0,2 \text{ h}^{-1}$ e $\text{EC}_{50} = 0,3 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{g/mL}$ para *Streptococcus pneumoniae*. As simulações PK (*in vivo*)-PD (*in vitro*) dos efeitos antimicrobianos do cefaclor no sítio de ação indicaram que a formulação de liberação modificada, quando administrada duas vezes ao dia, pode oferecer uma alternativa segura e conveniente para o tratamento com cefaclor.

LIU e colaboradores (2005) utilizaram o modelo E_{max} -sigmoidal para modelar a atividade antibacteriana da cefpodoxima e da cefixima *in vitro* frente a quatro cepas de microrganismos: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* sensível à penicilina e *Streptococcus pneumoniae* com sensibilidade intermediária à penicilina. Os experimentos *in vitro* simularam as concentrações livres teciduais de cefpodoxima e cefepima após diferentes regimes de dosagens e as curvas de morte bacteriana/tempo foram obtidas e modeladas. Os resultados evidenciaram, com base nos EC_{50} , que ambos os antimicrobianos apresentam potência alta e

semelhante contra cepas gram-negativas - *Haemophilus influenzae* (EC₅₀ cerca de 0,04 µg/mL) e *Moraxella catarrhalis* (EC₅₀ cerca de 0,12 µg/mL), enquanto que a cefpodoxima apresentou potência cerca de 10 vezes maior que a cefixima para cepas de *Streptococcus pneumoniae* (EC₅₀ para cepa sensível: 0,02 mg/L versus 0,27 µg/mL; EC₅₀ para cepa com sensibilidade intermediária: 0,09 µg/mL versus 0,69 µg/mL). Simulações baseadas no modelo E_{max} - sigmoidal e nos parâmetros farmacocinéticos para os níveis livres teciduais obtidos de estudos clínicos prévios mostraram que, com a mesma dose diária oriunda de esquemas de dosagens empregados clinicamente, a cefpodoxima teria uma eficácia clínica maior que a cefixima para infecções adquiridas na comunidade.

MOUTON e colaboradores (1997) propuseram uma modificação para o modelo E_{max} -sigmoidal, baseando-se no fato de que modelos *in vitro* apresentam fatores limitantes do crescimento do microrganismo como, por exemplo, nutrientes e espaço. Após a etapa de crescimento exponencial, uma cultura bacteriana atinge um platô em que a velocidade de multiplicação das bactérias diminui. Desse modo, foi proposta pelos autores a incorporação de mais um termo na equação de E_{max} -sigmoidal, representado por N_{max}, que indica o maior número de bactérias que uma cultura *in vitro* suporta até o momento de entrar na fase de platô (Equação 5):

$$\frac{dN}{dt} = \left\{ \left[k \cdot \left(1 - \frac{N}{N_{\max}} \right) \right] - \frac{k_{\max} \cdot C_t^s}{EC_{50}^s + C_t^s} \right\} \cdot N \quad (5)$$

onde, N_{max} é o número máximo de bactérias que o sistema permite crescer sem limitação.

PALMA e colaboradores (2003) empregaram o modelo PK/PD modificado por MOUTON e colaboradores (1997) para descrever o efeito bactericida do norfloxacinol contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, com diferentes perfis de susceptibilidade. As concentrações livres plasmáticas do norfloxacinol em humanos, após a administração de 400 mg deste pela via oral, foram simuladas frente às bactérias *in vitro*, por um período de 12 horas. O modelo empregado demonstrou que os valores de EC₅₀ aumentam proporcionalmente com a CIM. Ainda, a correlação obtida entre o

parâmetro EC_{50} e o índice ASC_{24}/CIM permitiu a previsão do parâmetro EC_{50} a partir da CIM para as bactérias e posologia investigadas.

2.4. Tratamento da Pneumonia Adquirida na Comunidade

Considerando-se a incidência por faixa etária, estima-se que no Brasil haja dois milhões e cem mil casos de PAC anuais. Apesar de sua incidência e custos elevados, existem poucos estudos sobre a frequência da PAC no Brasil e não se conhece diretamente sua real ocorrência na população. No Brasil, as pneumonias adquiridas na comunidade são a segunda causa de internação, respondendo por 783.480 casos em 2003, sendo a proporção maior nos meses de inverno (Datusus, 2003).

O manejo da PAC está progressivamente se tornando mais complicado, devido a diversos fatores como, por exemplo, o crescimento do espectro de organismos envolvidos na doença, o aumento da prevalência de resistência aos antimicrobianos, bem como o crescimento da população de pacientes de idade avançada e com comorbidades. Esses fatores têm levado a discussões importantes com relação à eficácia de diferentes abordagens para o tratamento da pneumonia, bem como o interesse em reduzir o número de hospitalizações desnecessárias.

O tratamento para pacientes com PAC geralmente é selecionado empiricamente após a avaliação da etiologia mais provável, considerando a prevalência da resistência ao antimicrobiano entre os organismos mais frequentemente envolvidos com a doença. A primeira consideração quando se seleciona um antimicrobiano para o tratamento da PAC é o espectro antimicrobiano (CUNHA, 2004), o qual deve incluir os microrganismos causadores mais comuns, como por exemplo, o *Streptococcus pneumoniae*.

A definição etiológica implicaria menores custos e menor toxicidade, por permitir melhor seleção do agente antimicrobiano, além de potencialmente reduzir a indução de resistência bacteriana. Todavia, a realização de testes que procuram identificar a etiologia não deve retardar o início do tratamento. Desse modo, a grande maioria dos tratamentos inicia de modo empírico.

Apesar dos antimicrobianos específicos serem prescritos, na grande maioria das vezes, apenas quando o diagnóstico etiológico é obtido, não existem estudos randomizados que demonstrem que a comprovação da etiologia da PAC resulte em menor mortalidade quando comparada com a evolução dos pacientes com antibioticoterapia empírica adequada instituída precocemente. Em um estudo com pacientes admitidos em UTI, melhor racionalização do tratamento após o isolamento etiológico foi verificada, com menor mortalidade (RELLO *et al.*, 2003).

Não é necessário realizar investigações microbiológicas de rotina em cada paciente com PAC. Essas investigações devem ser guiadas pela gravidade da pneumonia, fatores epidemiológicos de risco e resposta ao tratamento. O diagnóstico etiológico é desnecessário em doentes ambulatoriais, pela alta eficácia do tratamento empírico e baixa mortalidade (<1%). O diagnóstico etiológico tem valor limitado em pacientes internados (LIDMAN *et al.*, 2002), mas deve ser buscado em pacientes com PAC grave. Em casos que não respondem ao tratamento empírico adequado, pesquisas de diversos agentes no escarro, incluindo BAAR (bacilo álcool-ácidos resistente) e fungos e culturas devem ser solicitadas.

O *Streptococcus pneumoniae* não apenas é o microrganismo mais encontrado na PAC (Tabela 3), mas também está associado com doenças severas causadas por outros patógenos (FINE *et al.*, 1996; HEFFELFINGER *et al.*, 2000). Dois terços dos desfechos fatais associados com PAC ocorrem entre pacientes com doenças devido ao *Streptococcus pneumoniae* (MARRIE, 1999). O aumento da prevalência de resistência à penicilina e outros fármacos para o *Streptococcus pneumoniae* tem refletido em complicações consideráveis ao tratamento da PAC (GARAU, 2002).

Tabela 3. Microrganismos mais comuns em PAC, em ordem decrescente.

PAC ambulatoria (leve)	Internados, não em UTI	Internados em UTI (grave)
<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
<i>M. pneumoniae</i>	<i>M. pneumoniae</i>	Bacilos -negativos
<i>C. pneumoniae</i>	<i>C. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>
Vírus respiratórios	(Vírus respiratórios)	<i>Legionella sp</i>
<i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>S. aureus</i>
	<i>Legionella spp</i>	

(Adaptado do Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2004)

A diretriz para PAC em pacientes imunocompetentes, publicada no Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2004, estabelece tratamentos para pacientes não internados, pacientes internados e pacientes internados em UTI. Para pacientes não internados em tratamento ambulatorial, recomenda-se o uso de um macrolídeo como monoterapia, quando não houver co-morbidades. Macrolídeo mais um β -lactâmico ou fluorquinolona isolada é recomendado para tratamento inicial empírico de pacientes com doenças associadas que não preenchem critérios para internação. Amoxicilina-clavulanato ou outro β -lactâmico associado a inibidor de β -lactamase deve ser preferido para pacientes com suspeita de aspiração e infecção por anaeróbios (___, 2004).

Para pacientes internados em enfermarias, o tratamento deve ser feito com antimicrobianos administrados por via parenteral. Um macrolídeo como azitromicina ou claritromicina associado a um β -lactâmico como cefotaxima, ceftriaxona, ampicilina-sulbactam ou uma fluorquinolona respiratória isolada (gatifloxacino, levofloxacino, moxifloxacino) deve ser prescrito para pacientes sem uso recente de antimicrobianos (___, 2004).

Pacientes internados em UTI sem fatores de risco com PAC grave e sem risco de etiologia por pseudomonas, o tratamento sugerido é semelhante ao indicado para os tratados em enfermarias. *Pseudomonas aeruginosa* raramente causa PAC grave (3%); porém, na presença de fatores de risco específicos, tratamento com agentes antipseudomonas deve ser prescrito. A apresentação clínica da PAC grave é caracterizada pela presença de insuficiência respiratória, sepse grave ou choque séptico, correspondendo a 10% dos casos de pneumonias tratados em hospital (FINE *et al.*, 1996).

Fluorquinolonas respiratórias, tais como o levofloxacino e o gatifloxacino, são antimicrobianos com grande atividade contra *Streptococcus pneumoniae*, incluindo cepas e isolados resistentes à penicilina e macrolídeos, *Haemophilus influenzae*, *Legionella* spp., e agentes atípicos. Além disso, as fluorquinolonas possuem numerosas propriedades farmacocinéticas vantajosas, incluindo a alta penetração pulmonar e a alta biodisponibilidade, bem como baixa resistência potencial perfil de segurança desejável. Assim, as fluorquinolonas respiratórias em geral devem ser consideradas antimicrobianos apropriados de primeira escolha para o tratamento monoterapêutico da PAC em pacientes hospitalizados e não hospitalizados (Tabela 4), bem como em combinação com um β -lactâmico em pacientes que requerem admissão em unidade de

tratamento intensivo (NIEDERMAN *et al.*, 2001; MANDELL *et al.*, 2003; ALFAGEME *et al.*, 2005).

Tabela 4. Tratamento empírico em PAC para adultos imunocompetentes

Local de tratamento	Recomendação terapêutica
Paciente ambulatorial Previamente sadio Sem terapia prévia	Macrolídeo: azitromicina 500mg VO 1x/dia-5 dias*, ou claritromicina 500mg VO 12/12h 7-10 dias, ou telitromicina 800mg VO 1x, 5 dias*
Terapia antibiótico recente ou Doenças associadas (DPOC, DM, ICC, neoplasia)	Fluoroquinolona respiratória: Levofloxacino 500mg VO 1x/dia 7 dias, ou gatifloxacino 400mg VO 1x/dia 7 dias, moxifloxacino 400mg VO 1x/dia 7 dias
Contra-indicação para fluoroquinolona	Betalactâmico + macrolídeo: cefuroxima 500mg VO 2x/dia + macrolídeo ou amoxicilina 500mg VO 8/8h + macrolídeo
Suspeita de aspiração	Betalactâmico mais inibidor de betalactamase (ex.: amoxicilina-clavulanato 1g VO 12/12h) ou clindamicina 600mg VO 6/6h
Influenza + superinfecção bacteriana	Betalactâmico ou fluoroquinolona respiratória
Paciente internado Enfermaria Sem terapia prévia	Fluoroquinolona respiratória: Levofloxacino 500mg IV 1x/dia ou gatifloxacino 400mg IV 1x/dia, ou moxifloxacino 400mg IV 1x/dia OU Betalactâmico + macrolídeo: Ceftriaxona 2g IV/dia + claritromicina 500mg IV 12/12h ou + Azitromicina 500mg IV 1x/dia
Terapia antibiótico recente	Semelhante, a depender da terapia prévia
UTI – Sem risco de <i>P. aeruginosa</i>	Betalactâmico + macrolídeo ou fluoroquinolona: Ceftriaxona 2g IV/dia + claritromicina 500mg 2x/dia ou + Levofloxacino 500mg/dia ou gatifloxacino 400mg IV 1x/dia ou moxifloxacino 400mg IV 1x/dia
UTI – Com risco de <i>P. aeruginosa</i>	Agente antipseudomonas + ciprofloxacina ou agente antipseudomonas + aminoglicosídeo + fluoroquinolona ou macrolídeo: ceftazidima 1-2g IV 8/8h, ou cefepima 2g IV 12/12h ou piperacilina-tazobactam 4,5g IV 8/8h, ou imipenem 500mg IV 6/6h, ou meropenem 1g IV 6/6h + ciprofloxacina 400mg IV 12/12h + claritromicina 500mg IV 12/12h ou ceftazidima 1-2g IV 8/8h, ou cefepima 2g IV 12/12h ou piperacilina-tazobactam 4,5g IV 8/8h, ou imipenem 500mg IV 6/6h, ou meropenem 1g IV 6/6h + **amicacina 500mg IV 2x + levofloxacino 500mg 1x/dia

* Na presença de resposta evidente após 48-72 horas.

** Evitar em idosos e insuficiência renal.

(Adaptado de HEFFELFINGER *et al.*, 2000).

2.5. Dosagens de Fluorquinolonas para o Tratamento da Pneumonia Adquirida na Comunidade

Regimes de dosagens tradicionais das fluorquinolonas para tratar a PAC compreendem levofloxacino 500 mg, gatifloxacino 400 mg, ou moxifloxacino 400 mg, a cada 24 horas, com duração de 7-14 dias. A duração da terapia é variável, dependendo da severidade da doença e das características específicas do paciente, como por exemplo, idade e co-morbidades (HANS, 2004).

AWUNOR-RENNER (1979) relatou que quando a duração da terapia para tratamento da PAC era mais prolongada havia, de certa forma, uma tendência dos pacientes em descontinuar a mesma. Foi demonstrado que a adesão ao tratamento com regimes de doses recomendadas é inversamente proporcional ao número total de doses administradas diariamente (CLAXTON *et al.*, 2001; KARDAS, 2003).

O aumento da resistência antibacteriana tem levado a novas estratégias de tratamento que limitam a emergência de resistência. A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2000) recomenda o uso de antimicrobianos potentes pelo menor período possível de tratamento efetivo. Teoricamente, regimes posológicos contemplando altas doses e curtos períodos poderiam promover uma nova opção de tratamento para a PAC. Considerando que as fluorquinolonas são antimicrobianos concentração dependente, em que a relação entre a ASC de concentração plasmática e a CIM (ASC_{24}/CIM) ou a razão entre o pico de concentração plasmática e a CIM (C_{max}/CIM) são os índices PK/PD que melhor descrevem a efetividade do fármaco, o aumento do tamanho da dose diária devido à redução do intervalo entre doses causaria aumento proporcional na ASC e no C_{max} , levando, em teoria, a erradicação mais rápida e completa do microrganismo. A redução do período total de tratamento diminuiria a quantidade total de antimicrobianos utilizada e, assim, reduziria as exposições desnecessárias da flora comensal ao fármaco. O uso de antimicrobianos por menos tempo tem a vantagem adicional de poder aumentar a adesão do paciente ao tratamento (REYES *et al.*, 1997; SCHRAG *et al.*, 2001), que pode diminuir as falhas clínicas e reduzir o risco de desenvolvimento de resistência devido a interrupção prematura da terapia antimicrobiana.

A atividade concentração dependente das fluorquinolonas as tornam excelentes candidatos para investigar a utilidade de regimes com altas doses e curto período de tempo. A análise farmacodinâmica *in vitro* tem mostrado que a dose de 750 mg do levofloxacino promove a erradicação do *Streptococcus pneumoniae* mais rapidamente e promove a morte efetiva de organismos menos suscetíveis, incluindo cepas de *Streptococcus pneumoniae* resistentes ao ciprofloxacino (LISTER, 2002b).

Uma triagem clínica comparou a eficácia e a segurança do levofloxacino quando administrado na dose de 750 mg por 5 dias com a dose de 500 mg administrada por 10 dias (DUNBAR *et al.*, 2003). Ambos os regimes posológicos resultaram em eficácia clínica e erradicação microbiana (> 90%) comparável, em relação ao microrganismo causador da PAC. Quando os pacientes foram estratificados de acordo com a severidade da doença, a dose de 750 mg administrada por 5 dias demonstrou ser efetiva para PAC severa. Esta dose também demonstrou ser bem tolerada e consistente com o perfil de segurança estabelecido para este antimicrobiano. O perfil de segurança da dose de 750 mg do levofloxacino administrado uma vez ao dia é comparável aos perfis de segurança obtidos para as doses de 250 ou 500 mg administradas pelo mesmo período (CHIEN *et al.*, 1998). Desta maneira, a segurança da maior dose parece não limitar a terapia com o levofloxacino por um curto período de tempo. Além disso, a FDA aprovou o uso do levofloxacino para PAC, inclusive para tratamento da pneumonia nosocomial, com a dose de 750 mg uma vez ao dia. Entretanto, eventos adversos podem restringir o uso de doses maiores de outras fluorquinolonas respiratórias, devendo ser avaliada cada situação em particular quando doses diferentes das preconizadas são utilizadas.

O regime de dosagem considerado ideal para fluorquinolonas respiratórias fornece atividade bactericida adequada, eficácia clínica e segurança/tolerabilidade aceitáveis, sem promover o desenvolvimento de resistência. Desta forma, os regimes posológicos aprovados para as fluorquinolonas respiratórias compreendem levofloxacino 500 e 750 mg, gatifloxacino 400 mg ou moxifloxacino 400 mg, uma vez ao dia por 7-14 dias, e parecem satisfazer os critérios de segurança anteriormente comentados.

2.6. Quinolonas

Os primeiros agentes antibacterianos a serem usados como fármacos quimioterapêuticos em meados de 1920 foram os agentes sintéticos, as sulfonamidas. Desde a descoberta da penicilina e a sua entrada na clínica na década de 1940, o campo tem sido dominado nos últimos 50 anos pelos produtos naturais e seus derivados semi-sintéticos (APPELBAUM & HUNTER, 2000).

A era dos antimicrobianos quinolônicos começou com a descoberta inadvertida do ácido nalidíxico em 1962, durante a síntese da cloroquina, um agente antimalárico (APPELBAUM & HUNTER, 2000; O'DONNELL & GELONE, 2000; OWENS & AMBROSE, 2000). O ácido nalidíxico nunca se tornou um bom agente para tratar infecções sistêmicas, devido ao seu estreito espectro antibacteriano, pobre penetrabilidade tecidual, rápida emergência de resistência bacteriana e freqüentes efeitos adversos no sistema nervoso central, mas contribuiu para a construção de modificações estruturais que subseqüentemente melhoraram as propriedades terapêuticas e diminuíram os efeitos adversos das quinolonas (O'DONNELL & GELONE, 2000). Um melhor entendimento da relação estrutura-atividade e estrutura-toxicidade permitiu que as modificações na estrutura das quinolonas melhorasse as características farmacocinéticas, tolerabilidade, espectro de ação e a toxicidade de cada novo agente (OWENS & AMBROSE, 2000).

Diferentes sistemas de classificação têm sido utilizados na literatura para descrever a evolução da classe das quinolonas, mas, sob a ótica cronológica, pode-se identificá-las em distintas gerações: primeira geração (ácido nalidíxico), segunda geração (ácido oxolínico, cinoxacino e norfloxacino), terceira geração (ciprofloxacino, levofloxacino e ofloxacino) e quarta geração (moxifloxacino e gatifloxacino) (BLONDEAU, 2004).

2.6.1. Levofloxacino

O levofloxacino (Figura 9) é considerado uma fluorquinolona de terceira geração, cuja fórmula molecular é $C_{18}H_{20}FN_3O_4 \cdot \frac{1}{2} H_2O$, com peso molecular de 370,38. Quimicamente o levofloxacino é o (-)-(S)-9-flúor-2,3-diidro-3-metil-10-(4-metil-1-

piperazinil)-7-oxo-7H-pirido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazina-6-ácido-carboxílico hemihidratado. O levofloxacinó é o isômero D,L – do ofloxacinó racemato. O isômero L é significativamente mais ativo que o isômero D e é o componente ativo do ofloxacinó (WIMER & GARRISON, 1998).

O levofloxacinó está aprovado para o tratamento de indivíduos adultos com pneumonia adquirida na comunidade, exacerbações bacterianas agudas de bronquite crônica, pielonefrite crônica, infecções complicadas no trato urinário ou infecções complicadas e não complicadas na pele (WIMER & GARRISON, 1998).

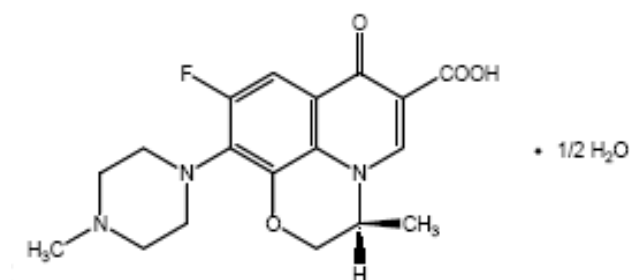


Figura 9. Estrutura molecular do levofloxacinó.

2.6.2. Gatifloxacinó

O gatifloxacinó, inicialmente denominado de AM-1155 ou CG 5501 (RONALD *et al.*, 1999) é uma 8-metoxifluorquinolona (Figura 10) com espectro de atividade antibacteriana frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas (SOEJIMA & SAITO, 1999; DUGGIRALA *et al.*, 2007). Quimicamente o gatifloxacinó é (±) –1-ciclopropil-6-fluor-1,4-diidro-8-metoxi-7-(3-metil-1-piperazinil)-4-oxo-3-acidoquinolinocarboxílico sesquihidratado. Sua fórmula molecular é C₁₉H₂₂FN₃O₄ com peso molecular igual a 375,39, apresentando-se na forma sesquihidratada C₁₉H₂₂FN₃O₄.3/2 H₂O. É um pó cristalino, branco a levemente amarelado que existe na forma de racemato sem rotação ótica considerável, cuja solubilidade é pH dependente. Possui ponto de fusão de 162 ° (The Merck Index, 2001).

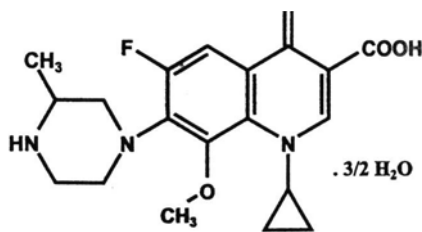


Figura 10. Estrutura molecular do gatifloxacino.

O gatifloxacino foi aprovado pela FDA em 1999 para ser comercializado inicialmente pela Bristol-Myers Squibb Company (Princeton, USA) com o nome comercial Tequin[®]. O fármaco está disponível nas formas farmacêuticas injetável, preparação ocular e comprimidos de 200 e 400 mg, sendo comercializado na forma de racemato.

As indicações do uso do gatifloxacino, segundo aprovação pela FDA, contemplam (Müller, 2000):

- exacerbação bacteriana aguda de bronquite crônica causada por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis* ou *Staphylococcus aureus*;
- sinusite aguda causada por *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae*;
- pneumonia adquirida na comunidade causada por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* ou *Legionella pneumophila*;
- infecções complicadas e não complicadas do trato urinário causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ou *Proteus mirabilis*;
- pielonefrite causada por *Escherichia coli*;
- gonorréia cervical e uretral não complicada;
- infecções retais agudas não complicadas em mulheres.

Embora também tenha sido aprovado para tratar conjuntivite, o gatifloxacino é mais comumente utilizado para tratar queratite e prevenir infecções em cirurgias de catarata (MATHER *et al.*, 2002; LEVINE *et al.*, 2004).

2.7. Propriedades Farmacocinéticas e Farmacodinâmicas do Levofloxacino e do Gatifloxacino

As fluorquinolonas respiratórias apresentam excelente biodisponibilidade, permitindo que doses equivalentes sejam administradas pelas vias i.v. e p.o. Caracterizam-se por excelente penetração na maioria dos tecidos e fluidos corporais. Elas distribuem-se, preferencialmente, no interior dos macrófagos alveolares e no fluido epitelial pulmonar, os quais compreendem sítios de infecção da PAC (ZHANEL *et al.*, 2002). Os longos tempos de meia-vida das fluorquinolonas, combinado com as suas propriedades farmacodinâmicas, permitem que a administração destes antimicrobianos possa ser feita uma vez ao dia.

Alguns dos antimicrobianos que são comumente empregados para o tratamento da PAC (por exemplo, β -lactâmicos) têm atividade bactericida tempo dependente. Para estes agentes, os melhores resultados clínicos são obtidos quando se mantêm as concentrações séricas do fármaco acima da CIM para o microrganismo considerado, pelo maior período de tempo possível. Isto pode ser conseguido quando se empregam doses menores e freqüentes destes agentes. As fluorquinolonas, no entanto, exibem atividade dependente da concentração, sendo os índices PK/PD (C_{max}/CIM e ASC_{24}/CIM) os melhores preditores de sua eficácia clínica. Em decorrência de ainda não se ter demonstrado conclusivamente qual destes dois índices PK/PD melhor se aplica para a terapia empregando as fluorquinolonas, ambas as relações procuram ser maximizadas. O *Streptococcus pneumoniae* é efetivamente erradicado e a emergência de resistência é prevenida quando se atinge um índice ≥ 30 para ASC_{24}/CIM (GUNDERSON *et al.*, 2001). Para infecções causadas por microrganismos gram-negativos, um índice ≥ 125 para ASC_{24}/CIM ou C_{max}/CIM de 10 são necessários para a erradicação efetiva (HANS, 2004).

Dados de sobrevivência *in vitro* (HURST *et al.*, 2002) sugerem que o gatifloxacino e o moxifloxacino são mais ativos que o levofloxacino, considerando os valores da CIM_{90} de 0,25 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ contra o *Streptococcus pneumoniae*, comparado com 1,0 $\mu\text{g/mL}$ para o levofloxacino. No entanto, o levofloxacino encontra concentrações séricas (C_{max}) e ASC maiores que o gatifloxacino nas doses recomendadas para tratamento da

PAC. No entanto, todas as fluorquinolonas respiratórias encontram valores de ASC suficientes para ultrapassar a razão ASC/CIM de 30.

O levofloxacino é rapidamente absorvido do trato gastrintestinal de humanos após administração oral. A biodisponibilidade absoluta de uma dose oral de 500 mg de levofloxacino é de aproximadamente 99% (OKAZAKI *et al.*, 1991; RARITAN, 1996; FISH & CHOW, 1997; CHIEN *et al.*, 1997a). Os perfis de contração plasmática do fármaco após administração intravenosa e oral são similares, podendo ser consideradas vias intercambiáveis. A administração com alimentos diminui a absorção (ASC) em 14%, porém não de maneira significativa, e prolonga o pico de concentração sérica em uma hora (RARITAN, 1996).

O volume de distribuição do levofloxacino varia de 1,09 - 1,26 L/kg após administração de doses únicas e múltiplas de 500 mg do fármaco, indicando alta penetração tecidual (OKAZAKI *et al.*, 1991; RARITAN, 1996). As concentrações pulmonares do levofloxacino são descritas como sendo de duas a cinco vezes àquelas encontradas no soro. A ligação a proteínas plasmáticas é de aproximadamente 30%, sendo concentração independente (ZHANEL & NOREDDIN, 2001).

O levofloxacino sofre metabolismo em pequena extensão, com 79 a 87% da dose administrada sendo recuperada de maneira inalterada na urina. O tempo de meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) está compreendido entre 6-9 horas (DAVIS & BRYSON, 1994; RARITAN, 1996; GOODWIN *et al.*, 1994; CHIEN *et al.*; 1997b), permanecendo inalterado após administrações repetidas (CHIEN *et al.*, 1998). O *clearance* corporal total é de aproximadamente 8,5 L/h, com um *clearance* renal médio de 7,14 L/h (DAVIS & BRYSON, 1994). Os parâmetros farmacocinéticos obtidos após a administração oral ou intravenosa do levofloxacino como dose única ou dose múltipla podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros farmacocinéticos do levofloxacino em humanos após administração de dose única ou múltipla intravenosa (i.v.) ou oral (p.o.).

Regime	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (h)	ASC (µg/h/mL)	Cl/F (mL/min)	t _{1/2} (h)	Cl _{renal} (mL/min)	Fonte
Dose única							
250 mg p.o.	2,8 ± 0,4	1,6 ± 1,0	27,2 ± 3,9	156 ± 20	7,3 ± 0,9	142 ± 21	RARITAN, 1996
500 mg p.o.	5,1 ± 0,8	1,3 ± 0,6	47,9 ± 6,8	178 ± 28	6,3 ± 0,6	103 ± 20	RARITAN, 1996
750 mg p.o.	7,1 ± 1,4	1,9 ± 0,7	82,0 ± 14,0	157 ± 28	7,7 ± 1,3	118 ± 28	CHIEN <i>et al.</i> , 1998
1000 mg p.o.	8,9 ± 1,9	1,7 ± 0,4	111,0 ± 21,0	156 ± 34	7,9 ± 1,5	113 ± 26	CHIEN <i>et al.</i> , 1998
500 mg i.v.	6,2 ± 1,0	1,0 ± 0,1	48,3 ± 5,4	175 ± 20	6,4 ± 0,7	112 ± 25	RARITAN, 1996
Dose múltipla							
500 mg p.o. 24/24h x 3 dias	6,6 ± 1,8	1,2 ± 0,5	53,5 ± 10,3	116 ± 35	7,9 ± 1,3	NA	CHILD <i>et al.</i> , 1995
500 mg p.o. 24/24h x 10 dias	5,7 ± 1,4	1,1 ± 0,4	47,5 ± 6,7	175 ± 25	7,6 ± 1,6	116 ± 31	RARITAN, 1996
750 mg p.o. 24/24h x 10 dias	8,6 ± 1,9	1,9 ± 0,7	91,0 ± 18,0	143 ± 29	8,8 ± 1,3	116 ± 28	CHIEN <i>et al.</i> , 1998
1000 mg p.o. 24/24h x 10 dias	11,8 ± 2,5	1,7 ± 0,6	118,0 ± 19,0	146 ± 29	8,9 ± 2,5	116 ± 23	CHIEN <i>et al.</i> , 1998
500 mg i.v. 24/24h x 10 dias	6,4 ± 0,8	NA	54,6 ± 11,1	158 ± 29	7,0 ± 0,8	99 ± 28	RARITAN, 1996

NA = não avaliado

O gatifloxacino, cuja biodisponibilidade é de 96% (LACRETA *et al.*, 2000), possui características farmacocinéticas que permitem que a sua administração seja feita a cada 24 horas. Em humanos, a farmacocinética é linear e dose independente na faixa de 200 a 800 mg (GAJJAR *et al.*, 2000; SARAVOLATZ & LEGGETT, 2003) quando administrado por um período de até 14 dias (SARAVOLATZ & LEGGETT, 2003).

As informações a respeito da farmacocinética do gatifloxacino, considerando doses e vias de administrações diferentes, estão compiladas na Tabela 6 e 7. Como

pode ser observado, o gatifloxacino apresenta, após a administração de dose única de 400 mg p.o., volume de distribuição ($V_{d\beta}/F$) de 2,2 L/kg, *clearance* (Cl/F) de 10,4 L/h, tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de $8,4 \pm 2,2$ h, concentração plasmática máxima (C_{max}) de $3,3 \pm 0,5$ mg/L e tempo para pico máximo (T_{max}) de 118 ± 39 min (NAKASHIMA *et al.*, 1995). Após a administração de dose múltipla de 400 mg p.o., os parâmetros farmacocinéticos do gatifloxacino foram *clearance* (Cl/F) de $12,0 \pm 1,8$ L/h, tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de $7,1 \pm 0,6$ h, concentração plasmática máxima (C_{max}) de $4,2 \pm 1,3$ mg/L e tempo para pico máximo (T_{max}) de 90 min (Bristol-Myers Squibb, 2000). Os perfis de concentração versus tempo dos enantiômeros *R*- e *S*- do gatifloxacino são essencialmente idênticos após administração oral em dose única de diferentes doses do racemato (Figura 11) (STAHLBERG *et al.*, 1999).

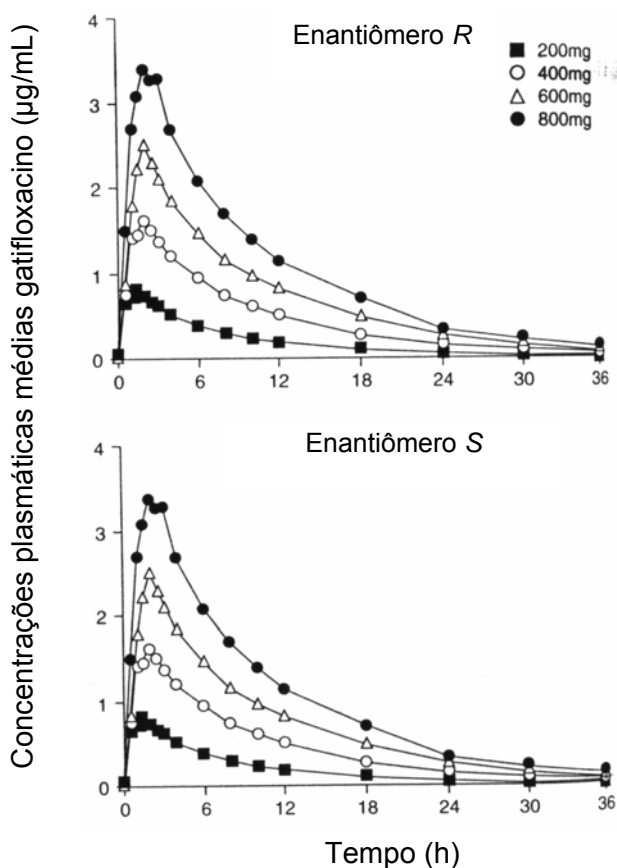


Figura 11. Concentrações plasmáticas médias dos enantiômeros do gatifloxacino após administração oral de dose única de 200, 400, 600 e 800 mg do racemato de gatifloxacino (Adaptado de STAHLBERG *et al.*, 1999).

A ligação a proteínas plasmáticas é de 20% e independe da concentração, distribuindo-se amplamente pelo organismo em muitos tecidos corporais e fluidos,

originando concentrações totais maiores nos tecidos alvos do que no soro (PERRY *et al.*, 1999; PICKERILL *et al.*, 2000; FISH & NORTH, 2001; SARAVOLATZ & LEGGETT, 2003), conforme pode ser visualizado na Tabela 8. As concentrações maiores encontradas nos macrófagos alveolares, parênquima pulmonar e fluido que reveste o epitélio pulmonar são importantes para patógenos que crescem extra e intracelularmente (KUHNKE & LODE, 2004).

A acumulação intracelular das fluorquinolonas é essencial para a sua atividade antimicrobiana e tem sido demonstrada ocorrer por difusão simples através da membrana celular da bactéria (PIDDOCK *et al.*, 1999), com alguma captação através de canais porínicos da membrana externa da bactéria (BRYAN *et al.*, 1989).

Tabela 6. Parâmetros farmacocinéticos do gatifloxacino em humanos após administração de dose múltipla oral (p.o.).

Dose (mg)	C _{max} (mg/L)	T _{max} (min)	Vd (L/kg)	Cl (L/h)	t _{1/2β} (h)	ASC ₀₋₂₄ (mg/h/L)	fe (%)	Fonte
400 p.o. ^c	4,2 ± 1,9	-	-	8,8 ± 2,9 ^a	-	51,3 ± 20,4	-	Dados em arquivo*
400 p.o. ^b	4,2 ± 1,3	90	-	12,0 ± 1,8 ^a	7,1 ± 0,6	34,4 ± 5,7	80 ± 12	Dados em arquivo*

^aCl/F; ^bvoluntários sadios; ^cpacientes com infecção; fe = fração do fármaco excretada inalterada na urina; * Dados em arquivo disponibilizados em material fornecido pela Bristol-Myers Squibb Company (Princeton, USA).

Tabela 7. Parâmetros farmacocinéticos do gatifloxacino em humanos após administração de dose única intravenosa (i.v.) ou oral (p.o.).

Dose (mg)	C _{max} (mg/L)	T _{max} (min)	Vd (L/kg)	Cl (L/h) ^b	t _{1/2β} (h)	ASC _{tot} (mg/h/L)	F (%)	fe (%)	fb (%)	Fonte
400 p.o.	3,97 ± 1,25	78 ± 30	-	11,6 ± 3,1	9,4 ± 1,8	35,5 ± 9,6	-	-	-	TRAMPUZ <i>et al.</i> , 2002
400 p.o.	4,10 ± 0,86	108 ± 56	-	-	6,8 ± 0,7	31,4 ± 3,6	-	65 ± 15	-	WISE <i>et al.</i> , 1999
400 p.o.	3,3 ± 0,5	118 ± 39	2,2 ^c	10,4	8,4 ± 2,2	32,4 ± 4,1	-	83 ± 4	20	NAKASHIMA <i>et al.</i> , 1995
400 p.o. ^d	3,8 ± 1,0	60	-	12,6 ± 2,4	7,8 ± 1,3	33 ± 6	96	72 ± 18	-	Dados em arquivo*
400 i.v. ^d	5,5 ± 1,0	-	1,5 ± 0,2 ^a	11,7 ± 2,0	7,4 ± 1,6	35,1 ± 6,7	-	62 ± 17	-	Dados em arquivo*
200 i.v. ^d	2,2 ± 0,3	60	1,9 ± 0,1 ^a	12,8 ± 2,2	11,1 ± 4,1	15,9 ± 2,6	-	72 ± 7	-	Dados em arquivo*
200 p.o. ^d	2,0 ± 0,4	60	-	14,5 ± 2,4	-	14,2 ± 0,4	-	74 ± 11	-	Dados em arquivo*

^aVd_{ss}/F; ^bCl/F; ^cVd_p/F; ^dvoluntários sadios, fe = fração do fármaco excretada inalterada na urina; fb = fração do fármaco ligada a proteínas. * Dados em arquivo disponibilizados em material fornecido pela Bristol-Myers Squibb Company (Princeton, USA).

Tabela 8. Relação fluido-tecido/soro do gatifloxacino em humanos.

Fluido ou tecido	Relação fluido-tecido/soro (faixa) ^a
Respiratório	
Macrófagos alveolares	26,5 (10,9-61,1)
Mucosa brônquica	1,65 (1,12-2,22)
Fluido do epitélio pulmonar	1,67 (0,81-4,46)
Parênquima pulmonar	4,09 (0,50-9,22)
Catarro (dose múltipla)	1,28 (0,49-2,38)
Pele	
Fluido de blister cutâneo	1,00 (0,50-1,47)
Reprodutivo	
Ejaculado	1,07 (0,86-1,32)
Fluido seminal	1,01 (0,81-1,21)
Vagina	1,22 (0,57-1,63)
Cérvix	1,45 (0,56-2,64)

^a Média das razões individuais coletadas por um período de 24 horas após administração de dose única (100, 150, 200, 300 ou 400 mg) ou múltipla (150 ou 200 mg) de gatifloxacino, exceto para fluido de blister cutâneo onde está apresentada a ASC média. Dados em arquivo disponibilizados em material fornecido pela Bristol-Myers Squibb Company (Princeton, USA).

Considerando os aspectos farmacodinâmicos, a enzima DNA girase foi o primeiro alvo terapêutico identificado para as quinolonas, baseado em estudos genéticos iniciais com mutantes de *Escherichia coli* resistente ao ácido nalidíxico (HOOPER, 1999). O levofloxacino e o gatifloxacino demonstram atividade bactericida por ligarem-se equivalentemente às topoisomerasas II (DNA girase) e IV. A girase é um tetrâmero composto de duas subunidades – *GyrA* e *GyrB*, enquanto que a topoisomerase IV apresenta as subunidades *ParC* e *ParE*. Por se ligarem a estas enzimas, estas fluorquinolonas interferem com a replicação, reparo e transcrição do DNA, resultando em morte bacteriana (HOOPER, 1993; HOOPER, 1999; ANDRIOLE, 1999; APPELBAUM & HUNTER, 2000; ROUSSEAU, 2002; SCHIMITZ *et al.*, 2002; SARAVOLATZ & LEGGETT, 2003; BLONDEAU, 2004).

Devido à emergência de resistência em pneumococos em todo o mundo, as novas fluorquinolonas tornaram-se uma opção preferencial para o tratamento. Por outro lado, bactérias resistentes a fluorquinolonas têm surgido em diferentes partes do mundo. Embora a resistência a esta classe de fármacos ainda seja pequena, poder-se-á tornar um problema futuramente, caso seu uso seja feito de maneira incorreta. Na tentativa de diminuir a velocidade de resistência às novas fluorquinolonas, recomenda-se que as mesmas sejam utilizadas apenas em infecções pneumocócicas com microrganismos resistentes à penicilina (penicilina CIM $\geq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$), ou em pacientes que são alérgicos a agentes alternativos, ou em casos em que os regimes alternativos não se mostraram eficazes (HEFFELFINGER, 2000). Neste sentido, é importante considerar as fluorquinolonas como agentes de primeira escolha quando houver alta frequência de resistência a pneumococos, ou em pacientes idosos e com comorbidades, nos quais patógenos resistentes ou não usuais podem estar presentes (KUHNKE & LODE, 2004).

A resistência às quinolonas ocorre através de dois mecanismos principais. Primeiramente, as mutações nos genes bacterianos que codificam as enzimas DNA girase e topoisomerase IV e, secundariamente, por bombas de efluxo ativo, o que acarreta uma diminuição das concentrações intracelulares do fármaco (KUHNKE & LODE, 2004).

O mecanismo mais importante de resistência desta classe de fármacos é mediado através de alterações nos genes que codificam as enzimas, ocorrendo em uma área denominada de “região determinante de resistência às quinolonas” (QRDR). Em algumas espécies, as primeiras alterações ocorrem na *GyrA* e, ocasionalmente, na *GyrB*, enquanto em outras elas ocorrem na subunidade *ParC* e, menos comumente, na *ParE*. Ainda, parece haver um alvo preferencial: em patógenos gram-positivos, mutações ocorrem mais frequentemente na topoisomerase IV, enquanto que alterações na DNA girase são mais comuns em bactérias gram-negativas (DRLICA & ZHAO, 1997). A resistência às fluorquinolonas para *Streptococcus pneumoniae* está baseada em mutações nos genes de ambas as enzimas - topoisomerase IV e DNA girase (JONES *et al.*, 2000).

Diversos estudos estão publicados na literatura envolvendo testes de susceptibilidade de *Streptococcus pneumoniae* ao levofloxacino e ao gatifloxacino, cujas

CIM₉₀ – Concentração Inibitória Mínima para inibição do crescimento de 90% das amostras testadas podem ser encontradas nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9. Atividade *in vitro* do levofloxacino contra *Streptococcus pneumoniae*.

Espécie de <i>Streptococcus</i>	Nº de cepas testadas	CIM ₉₀ (µg/mL)	Faixa da CIM (µg/mL)	Fonte
<i>S. pneumoniae</i>	475	1	-	ODLAND <i>et al.</i> , 1999
<i>S. pneumoniae</i>	550	1	-	KOETH <i>et al.</i> , 2002
<i>S. pneumoniae</i>	2245	1	≤0,12 - 32	LOW <i>et al.</i> , 2002
<i>S. pneumoniae</i>	-	1	0,12 - 8	MOROSINI <i>et al.</i> , 2001
<i>S. pneumoniae</i> ^a	236	2	-	MILATOVIC <i>et al.</i> , 2000
<i>S. pneumoniae</i> ^a	129	1	0,5 -16	BLONDEAU <i>et al.</i> , 2000
<i>S. pneumoniae</i> ^b	250	1	0,12 - >16	MILATOVIC <i>et al.</i> , 2000
<i>S. pneumoniae</i> ^b	1027	2	-	ODLAND <i>et al.</i> , 1999
<i>S. pneumoniae</i> ^c	-	1	0,12 - 1	MAROSINI <i>et al.</i> , 2001

^a*Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina; ^b*Streptococcus pneumoniae* não resistente à penicilina; ^c*Streptococcus pneumoniae* resistente a eritromicina.

Tabela 10. Atividade *in vitro* do gatifloxacino contra *Streptococcus pneumoniae*.

Espécie de <i>Streptococcus</i>	Nº de cepas testadas	CIM ₉₀ (µg/mL)	Faixa da CIM (µg/mL)	Fonte
<i>S. pneumoniae</i>	301	0,50	0,12 - 16	JONES <i>et al.</i> , 1999a
<i>S. pneumoniae</i>	1717	0,50	0,06 - > 4	JONES <i>et al.</i> , 1999b
<i>S. pneumoniae</i>	475	0,50	-	ODLAND <i>et al.</i> , 1999
<i>S. pneumoniae</i>	550	0,50	-	KOETH <i>et al.</i> , 2002
<i>S. pneumoniae</i> ^a	236	0,50	-	ODLAND <i>et al.</i> , 1999
<i>S. pneumoniae</i> ^a	4	0,50	0,25 - 0,5	BLONDEAU <i>et al.</i> , 2000
<i>S. pneumoniae</i> ^a	24	0,50	0,125 - 3	BASSETTI <i>et al.</i> , 2001
<i>S. pneumoniae</i> ^a	207	0,50	0,125 - 1	HOELLMAN <i>et al.</i> , 2001
<i>S. pneumoniae</i> ^b	176	0,50	0,03 - 1	REINERT <i>et al.</i> , 2000
<i>S. pneumoniae</i> ^b	1027	0,50	-	ODLAND <i>et al.</i> , 1999
<i>S. pneumoniae</i> ^b	334	0,50	≤ 0,016 - 8	BLONDEAU <i>et al.</i> , 2000
<i>S. pneumoniae</i> ^b	51	0,38	0,094 - 0,5	BASSETTI <i>et al.</i> , 2001
<i>S. pneumoniae</i> ^b	207	0,50	0,25 - 2	HOELLMAN <i>et al.</i> , 2001
<i>S. pneumoniae</i> ^c	180	0,25	≤ 0,063 - 0,5	JOHNSON <i>et al.</i> , 2001

^a*Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina; ^b*Streptococcus pneumoniae* não resistente à penicilina; ^c*Streptococcus pneumoniae* resistente a macrolídeos.

2.8. Referências

ALFAGEME, I.; ASPA, J.; BELLO, C. *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of community-acquired pneumonia. Spanish Soc. Pulmonol. Thoracic Surgery (SEPAR). *Arch. Broncopneumol.* v. 4, p. 272-289, 2005.

AMBROSE, P. G.; GRASELA, D. M.; GRASELA, T. H.; PASSARELL, J.; MAYER, H. B.; PIERCE, P. F. Pharmacodynamics of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* in patients with community-acquired respiratory tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 45, n. 10, p. 2793-2797, 2001.

AMINIMANIZANI, A.; BERINGER, P.; JELLIFFE, R. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the newer fluoroquinolone antibacterial. *Clin. Pharmacokinet.* v. 40, n. 3, p. 169-187, 2001.

AMSDEN, G. W. Interrelationship of pharmacokinetics/pharmacodynamics: antibiotic dosing for the future. *Eur. Respir. Mon.* v. 28, p. 1-12, 2004.

ANDES, D.; CRAIG, W. A. Pharmacodynamics of fluoroquinolones in experimental models of endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* v. 27, p. 47-50, 1998.

- ANDRIOLE, V. T. The future of the quinolones. *Drugs*. v. 58, Supplement 2, p. 1-5, 1999.
- APPELBAUM, P. C.; HUNTER, P. A. The fluoroquinolone antibacterial: past, present and future perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents*. v. 16, p. 5-15, 2000.
- AWUNOR-RENNER C. Length of antibiotic therapy in in-patients with primary pneumonia. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. v. 73, p. 235-240, 1979.
- BASSETTI, M.; DEMBRY, L. M.; FARREL, P. A. ; CALLAN, D. A. ; ANDRIOLE, V. T. Comparative antimicrobial activity of gatifloxacin with ciprofloxacin and beta-lactams against gram-positive bacteria. *Diagn. Microb. Infect Dis*. v. 41, p. 143-148, 2001.
- BEDOS, J. P.; AZOULAY-DUPUIS, E.; MOINE, P.; MUFFAT-JOLY, M.; VEBER, B.; POCIDALO, J. J.; VALLEE, E. Pharmacodynamic activities of ciprofloxacin and sparfloxacin in a murine pneumococcal model: relevance for drug efficacy. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. v. 286, p. 29-35, 1998a.
- BEDOS, J. P.; RIEUX, V.; BOUCHET, J.; MUFFAT-JOLY, M.; CARBON, C.; AZOULAY-DUPUIS, E. Efficacy of trovafloxacin against penicillin-susceptible and multiresistant strains of *Streptococcus pneumoniae* in a mouse pneumonia model. *Antimicrob. Agents Chemother*. v. 42, n. 4, p. 862-867, 1998b.
- BELLMANN, R.; KUCHLING, G.; DEGHANYAR, P.; ZEITLINGER, M.; MINAR, E.; MAYER, B. X.; MÜLLER, M.; JOUKHADAR, C. Tissue pharmacokinetics of levofloxacin in human soft tissue infections. *Br. J. Clin. Pharmacol*. v. 57, n. 5, p. 563-568, 2004.
- BLONDEAU, J. M.; LASKOWSKI, R.; BJARNASON, J.; STEWART, C. Comparative *in vitro* activity of gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, moxifloxacin and trovafloxacin against 4151 gram-negative and gram-positive organisms. *Int. J. Antimicrob. Agents*. v. 14, p. 45-50, 2000.
- BLONDEAU, J. M. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv. Ophthalmol*. v. 49, Supplement 2, p. S73-S78, 2004.
- BOLINDER, J.; UNGERSTEDT, U.; ARNER, P. Long term continuous glucose monitoring with microdialysis in ambulatory insulin-dependent diabetic patients. *Lancet*. v. 342, p. 1080-1085, 1993.
- Bristol-Myers Squibb. Gatifloxacin T. Princeton (NJ): 2000 (Data on file).
- BRUNNER, M.; HOLLESNSTEIN, U.; DELACHER, S.; JAGER, D.; SCHMID, R.; LACKNER E.; GEORGOPOULOS, A.; EICHLER, H. G.; MÜLLER, M. Distribution and antimicrobial activity of ciprofloxacin in human soft tissues. *Antimicrob. Agents Chemother*. v. 43, n. 5, p. 1307-1309, 1999.
- BRUNNER, M.; PERNERSTORFER, T.; MAYER, B.; EICHELER, H. G.; MÜLLER, M. Surgery and intensive care procedures affect the target site distribution of piperacillin. *Crit. Care Med*. v. 28, n. 6, p. 1754-1759, 2000.
- BRYAN, L. E.; BEDARD, J.; WONG, S.; CHAMBERLAND, S. Quinolone antimicrobial agents: mechanism of action and resistance development. *Clin. Invest. Med*. v. 12, p. 14-19, 1989.

CHAURASIA, C. S. *et al.* AAPS-FDA workshop white paper microdialysis principles, application, and regulatory perspectives report from the joint AAPS-FDA workshop, november 4-5, 2005, Nashville, TN. *The AAPS*. v. 9, n. 1, p. E48-E59, 2007.

CHIED, J.; MORTIBOY, D.; ANDREWS, J. M. *et al.* Open-label crossover study to determine pharmacokinetics and penetration of two dose regimens of levofloxacin into inflammatory fluid. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 39, n. 12, p. 2749-2751, 1995.

CHIEN, S. C.; ROGGE, M. C.; GISCLON, L. G. *et al.* Pharmacokinetic profile of levofloxacin following once-daily 500-milligram oral or intravenous doses. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 41, n. 10, p. 2256-2260, 1997a.

CHIEN, S. C.; CHOW, A. T. ; NATARAJAN, J. *et al.* Absence of age and gender effects on the pharmacokinetics of a single 500 milligram oral dose of levofloxacin in healthy subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 41, n. 7, p. 1562-1565, 1997b.

CHIEN, S. C.; WONG, F. A.; FOWLER, C. L. *et al.* Double-blind evaluation of the safety and pharmacokinetics of multiple oral once-daily 750-milligram and 1-gram doses of levofloxacin in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 42, n. 4, p. 885-888, 1998.

CLAXTON, A. J.; CRAMER, J.; PIERCE, C. A systematic review of the associations between dose regimens and medication compliance. *Clin. Ther.* v. 23, p. 1296-1310, 2001.

Clinical Laboratory Standardization Institute. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard – Sixth edition. NCCLS document M7-A6, Wayne, Pennsylvania, USA.

COLICE, G. L.; MORLEY, M. A.; ASCHE, C. *et al.* Treatment costs of community-acquired pneumonia in an employed population. *Chest* v. 125, p. 2140-2145, 2004.

CRAIG, W. Qualitative susceptibility versus quantitative MIC tests. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* v. 16, p. 231, 1993.

CRAIG, W. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and man. *Clin. Infect Dis.* v. 26, p. 1-12, 1998.

CUNHA, B. A. Empiric therapy of community acquired pneumoniae. Guidelines for the perplexed? *Chest*. v. 125, p. 1913-1919, 2004.

DALLA COSTA, T.; DERENDORF, H. AUIC – a general target for the optimization of dosing regimens of antibiotics. *Ann. Pharmacother.* v. 30, p. 1024-1028, 1996.

DALLA COSTA, T.; NOLTING, A.; KOVAR, A.; DERENDORF, H. Determination of free interstitial concentrations of piperacillin-tazobactam combinations by microdialysis. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 42, p. 769-778, 1998.

DAVIS, R.; BRYSON, H. M. Levofloxacin: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutics efficacy. *Drugs*. v. 47, p. 677-700, 1994.

DEGUCHI, 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 -lactam antibiotics in interstitial fluids). *J. Pharmacobiodyn.* v. 15, p. 79-89, 1992.

DE LA PEÑA, A.; DALLA COSTA, T.; TALTON, J. D.; REHAK, E.; GROSS, J.; THYROFF-FRIESINGER, U.; WEBB, A. I.; MÜLLER, M.; DERENDORF, H. 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.

DE LA PEÑA, A.; BRUNNER, M.; EICHLER, H. G.; REHAK, E.; GROSS, J.; THYROFF-FRIESINGER, U.; MÜLLER, M.; DERENDORF, H. Comparative target site pharmacokinetics of immediate- and modified-release formulations of cefaclor in humans. *J. Clin. Pharmacol.* v. 42, p. 403-411, 2002.

DE LA PEÑA, A.; GRÄBE, A.; RAND, K. H.; REHAK, E.; GROSS, J.; THYROFF-FRIESINGER, U.; MÜLLER, M.; DERENDORF, H. PK-PD modelling of the effect of cefaclor on four different bacterial strains. *Int. J. Antimicrob. Agents.* v. 23, p. 218-225, 2004.

DELACHER, S.; DERENDORF, H.; HOLLENSTEIN, U.; BRUNNER, M.; JOUKHADAR, C.; HOFMANN, S.; GEORGOPOULOS, A.; EICHLER, H. G.; MÜLLER, M. A combined *in vivo* pharmacokinetic – *in vitro* pharmacodynamic approach to simulate target site pharmacodynamics of antibiotics in humans. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 46, p. 733-739, 2000.

DERENDORF, H.; HOCHHAUS, G. (Ed) *Pharmacokinetics Pharmacodynamics Correlation*. Boca Raton: CRC Press, 1995.

DERENDORF, H.; MEIBOHM, B. Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationship: concepts and perspectives. *Pharm. Res.* v. 6, n. 2, p. 176-185, 1999.

Diretriz para Pneumonias Adquiridas na Comunidade em Adultos Imunocompetentes. *J. Bras. Pneumol.* v. 30, p. 1S-24S, 2004.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 61, p. 377-392, 1997.

DRUSANO, G. L.; STANDIFORD, H. C.; MOODY, M. R.; SCHIMPF, S. C. Integration of selected pharmacologic and microbiologic properties of three new betalactam antibiotics: a hypothesis for rational comparison. *Rev. Infect. Dis.* v. 6, p. 357-363, 1984.

DRUSANO, G. L.; JOHNSON, D. E.; ROSEN, M.; STANDIFORD, H. C. Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of *Pseudomonas sepsis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 37, n. 3, p. 483-490, 1993.

DUGGIRALA, A.; JOSEPH, J.; SHARMA, S.; NUTHETI, R.; GARG, P.; DAS, T. Activity of newer fluoroquinolones against gram-positive and gram-negative bacteria isolated from ocular infections: An *in vitro* comparison. *Indian J Ophthalmol.* v. 55, p. 15-19, 2007.

DUNBAR, L. M.; WUNDERINK, R. G.; HABIB, M. P. *et al.* High-dose, short course levofloxacin for community-acquired pneumonia: A new treatment paradigm [published

correction appears in Clin Infect Dis. 2003; 37:1147]. *Clin Infect Dis.* v. 37, p. 752-760, 2003.

DURING M. J.; SPENCER, D. D. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet.* v. 341, p. 1607-1610, 1993.

EBERT, S. C.; CRAIG, W. A. Pharmacodynamic properties of antibiotics: application to drug monitoring and dosage regimen design. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* v. 11, p. 319-326, 1990.

EBERT, S. C. Application of pharmacokinetics and pharmacodynamics to antibiotic selection. *P&T.*, v. 29, n. 4, p. 244-250, 2004.

EBISU, H.; KISHIL, R.; TAKEI, M.; FUKUDA, H. The effect of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) parameters of gatifloxacin on its activity and resistance selectivity against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Chemother.* v. 9, p. 210-214, 2003.

EISENBERG, E. J.; CONZENTINO, P.; EICKHOFF, W. M.; CUNDY, K. C. Pharmacokinetic measurement of drugs in lung epithelial lining fluid by microdialysis: aminoglycoside antibiotics in rat bronchi. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* v. 29, p. 93-98, 1993.

ELMQUIST, W. F.; SAWCHUK, R. J. Use of microdialysis in drug delivery studies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* v. 45, p. 123-124, 2000.

EMA. *Points to consider on pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antibacterial medicinal products.* Disponível em: <<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ewp/265599en.pdf>>. Acesso em 05 de fevereiro de 2006.

FDA Guidance for Industry. *Developing antimicrobial drugs – general considerations for clinical trials.* Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/2580dft.pdf>>. Acesso em 05 de fevereiro de 2006.

FERNANDEZ, J.; BARRET, J. F.; LICATA, L.; AMARATUNGA, D.; FROSCO, M. Comparison of efficacies of oral levofloxacin and oral ciprofloxacin in a rabbit model of a staphylococcal abscess. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 43, n. 3, p. 667-671, 1999.

FILE, T. M. Jr. Treatment of pneumonia in hospitalized patients. In: NIGHTINGALE, C. H.; AMBROSE, P. G.; FILE, M. T. Jr (ed). 1 ed. Community-acquired respiratory infections-antimicrobial management. New York: Marcel Dekker, 255-278, 2003.

FILE, T. M. Jr. Antimicrobial therapy of community acquired pneumonia. *Infect Dis. Clin North Am.* v. 18, p. 993-1016, 2004.

FINE, M. J.; SMITH, M. A.; CARSON, C. A. *et al.* Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. A meta-analysis. *JAMA* v. 275, p. 134-141, 1996.

FISH, D. N.; CHOW, A. T. The clinical pharmacokinetics of levofloxacin. *Clin Pharmacokinet.* v. 32, p. 101-119, 1997.

- FISH, D. N.; NORTH, D. S. Gatifloxacin, an advanced 8-methoxy fluoroquinolone. *Pharmacother.* v. 21, p. 35-59, 2001.
- FORREST, A.; NIX, D. E.; BALLOW, C. H.; GOSS, T. F.; BIRMINGHAM, M. C.; SCHENTAG, J. J. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in serious ill patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 37, n. 5, p. 1073-1081, 1993.
- FORREST, A.; CHODOSH, S.; AMANATEA, M. A.; COLLINS, D. A.; SCHENTAG, J. J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral grepafloxacin in patients with acute exacerbations of chronic bronchitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 40, Supplement A, p. 45-57, 1997.
- FRIDMODT-MOLLER, N. How predictive is PK/PD for antibacterial agents? *Int. J. Antimicrob. Agents.* v. 19, p. 333-339, 2002.
- FROSSARD, M.; JOUKHADAR, C.; EROVIC, B. M.; DITTRICH, P.; MRASS, P. E.; VAN HOUTE, M.; BURGMANN, H.; GEORGOPOULOS, A.; MÜLLER, M. Distribution and antimicrobial activity of fosfomycin in the interstitial fluid of human soft tissues. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 44, n. 10, p. 2728-2732, 2000.
- GAJJAR, D. A.; LACRETA, F. P.; UDERMAN, H. D. A dose-escalation study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of intravenous gatifloxacin in healthy adult men. *Pharmacotherapy.* v. 20, p. 49S-58S, 2000.
- GARAU, J. Treatment of drug-resistant pneumococcal pneumonia. *Lancet Infect. Dis.* v. 2, p. 404-415, 2002.
- GAVALDÀ, J.; CAPDEVILA, J. A.; ALMIRANTE, B.; OTERO, J.; RUIZ, I.; LAGUARDA, M.; ALLENDE, H.; CRESPO, E.; PIGRAU, C.; PAHISSA, A. Treatment of experimental pneumonia due to penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in immunocompetent rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 41, n. 4, p. 795-801, 1997.
- GOODWIN, S. D.; GALLIS, H. A.; CHOW, A. T. *et al.* Pharmacokinetics and safety of levofloxacin in patients with human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 38, p. 700-804, 1994.
- GUNDERSON, B. W.; ROSS, G. H.; IBRAHIM, K. H.; ROTSCHAFFER, J. C. What do we really know about antibiotic pharmacodynamics? *Pharmacother.* v. 21 (Suppl 11): S302-S318, 2001.
- HANS, H. L. Use of the respiratory fluoroquinolones for the outpatient management of community-acquired pneumonia. *Cur. Ther. Res.* v. 65, n. 3, 225-238, 2004.
- HEFFELFINGER, J. D.; DOWELL, S. F.; JORGENSEN, J. H. *et al.* Management of community-acquired pneumonia in the era of pneumococcal resistance: a report from the drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Arch. Intern. Med.* v. 160, p. 1399-1408, 2000.
- HERKNER, H.; MÜLLER, M. R.; KREISCHITZ, N.; MAYER, B. X.; FROSSARD, M.; JOUKHADAR, C.; KLEIN, N.; LACKNER, E.; MÜLLER, M. Closed-chest microdialysis to measure antibiotic penetration into human lung tissue. *Am. J. Crit. Care Med.* v. 165, n. 2, p. 273-276, 2002.

HIGHET, V. S.; FORREST, A.; BALLOW, C. H.; SCHENTAG, J. J. Antibiotic dosing issues in lower respiratory tract infection: population-derived area under inhibitory curve is predictive of efficacy. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 43, Supplement A, p. 55-63, 1999.

HOELLMAN, D. B.; LIN, G.; JACOBS, M. R.; APPELBAUM, P. C. Anti-pneumococcal activity of gatifloxacin compared with other quinolone and non-quinolone agents. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 43, p. 645-649, 1999.

HOOPER, D. C. Quinolone mode of action – new aspects. *Drugs.* v. 45, Supplement 3, p. 8-14, 1993.

HOOPER, D. C. Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs.* v. 58, Supplement 2, p. 6-10, 1999.

HURST, M.; LAMB, H. M.; ACOTT, L. J.; FIGGITT, D. P. Levofloxacin: An update review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs.* v. 62, p. 2127-2167, 2002.

HUTSCHALA, D.; SKHIRTLADZE, K.; ZUCKERMANN, A.; WISSER, W.; JAKSCH, P.; MAYER-HELM, B. X.; BURGMANN, H.; WOLNER, E.; MÜLLER, M.; TSCHERNKO, E. M. *In vivo* measurement of levofloxacin penetration into lung tissue after cardiac surgery. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 49, n. 12, p. 5107-5111, 2005.

JACOBS, M. R. Optimisation of antimicrobial therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamics parameters. *Clin. Microbiol. Infect.* v. 7, p. 589-596, 2001.

JOHANSEN, M. J.; NEWMAN, R. A.; MADDEN, T. The use of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacother.* v. 17, n. 3, p. 464-481, 1997.

JOHNSON, A. N.; BENJAMIN JR, W. H.; GRAY, B. M.; CRAIN, M. C.; EDWARDS, K. M.; WAITES, K. B. *In vitro* activity of ABT-773, telithromycin and eight others antimicrobials against erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* respiratory isolates of children. *Int. J. Antimicrob. Agents.* v. 18, p. 531-535, 2001.

JONES, R. N.; JOHNSON, D. M.; ERWIN, M. E.; BEACH, M. L.; BIEDENBACH, D. J. Antistreptococcal activity of gatifloxacin. *Drugs.* v. 58, Supplement 2, p. 164-166, 1999a.

JONES, R. N.; PFALLER, M. A.; DOERN, G. V.; BEACH, M. Antimicrobial spectrum of gatifloxacin in the SENTRY program. *Drugs.* v. 58, Supplement 2, p. 173-175, 1999b.

JONES, M. E.; SAHM, D. F.; MARTIN, N.; SCHEURING, S.; HEISIG, P.; THORNSBERRY, C.; KÖHRER, K.; SCHMITZ, F. J. Prevalence of gyrA, gyrB, parC, and parE mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluoroquinolones and originating from Worldwide Surveillance Studies during the 1997-1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 44, n. 2, p. 462-466, 2000.

JONES, R. N.; MANDELL, L. A. Fluoroquinolones for the treatment of outpatient community-acquired pneumonia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* v. 44, p. 69-76, 2002.

JOUKHADAR, C.; DERENDORF, H.; MÜLLER, M. Microdialysis – a novel tool for clinical studies of anti-infective agents. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* v. 57, p. 211-219, 2001a.

JOUKHADAR, C.; FROSSARD, M.; MAYER, B. X.; BRUNNER, M.; KLEIN, N.; SIOSTRZONEK, P.; EICHLER, H. G.; MÜLLER, M. Impaired target site penetration of β -lactams may account for therapeutic failure in patients with septic shock. *Crit. Care Med.* v. 29, n. 2, p. 385-391, 2001b.

JOUKHADAR, C.; KLEIN, N.; MAYER, B. X.; KREISCHITZ, N.; DELLE-KARTH, G.; PALKOVITS, P.; HEINZ, G.; MÜLLER, M. Plasma and tissue pharmacokinetics of cefpirome in patients with sepsis. *Crit. Care Med.* v. 30, n. 7, p. 1478-1482, 2002.

JOUKHADAR, C.; KLEIN, N.; DITTRICH, P.; ZEITLINGER, M.; GEPPERT, A.; SKHIRTLADZE, K.; FROSSARD, M.; HEINZ, G.; MÜLLER, M. Target site penetration of fosfomycin in critically ill patients. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 51, p. 1247-1252, 2003.

KARDAS, P. Once-daily dosage secures better compliance with antibiotic therapy of respiratory tract infections than twice-daily dosage. *J. Appl. Res.* v. 3, p. 201-206, 2003.

KENNERGREN, C.; MANTOVANI, V.; LÖNNROTH, P.; NYSTROM, B.; BERGLIN, E.; HAMBERGER, A. Monitoring of extracellular aspartate aminotransferase and troponin T by microdialysis during and after cardioplegic heart arrest. *Cardiology.* v. 92, p. 162-170, 1999.

KLEPSEK, M. E.; ERNST, E. J.; PETZOLD, C. R.; RHOMBERG, P.; DOERN, G. V. Comparative bactericidal activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in a dynamic *in vitro* model. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 45, n. 3, p. 673-678, 2001.

KNUDSEN, J. D.; FRIMODT-MOLLER, N.; ESPERSEN, F. Experimental *Streptococcus pneumoniae* infection in mice for studying correlation of *in vitro* and *in vivo* activities of penicillin against pneumococci with various susceptibilities to penicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 39, n. 6, p. 1253-1258, 1995.

KOETH, L. M.; JACOBS, M. R.; BAJAKSOUZIAN, S.; ZILLES, A.; LIN, G.; APPELBAUM, P. C. Comparative *in vitro* activity of gemifloxacin to other fluoroquinolones and non-quinolone agents against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in the United States in 1999-2000. *Int. J. Antimicrob. Agents.* v. 19, p. 33-37, 2002.

KUHNKE, A.; LODE, H. Fluoroquinolones and lower respiratory tract infections. *Eur. Respir. Mon.* v. 28, p. 94-112, 2004.

LACRETA F., P.; KAUL, S.; KOLLIA, G. D.; DUNCAN, G.; RANDALL, D. M.; GRASELA D. M. Interchangeability of 400-mg intravenous and oral gatifloxacin in healthy adults. *Pharmacotherapy.* v. 20, p. 59S-66S, 2000.

LACY, M. K.; LU, W.; XU, X.; TESSIER, P. R.; NICOLAU, D. P.; QUINTILIANI, R.; NIGHTINGALE, C. H. Pharmacodynamic comparisons of levofloxacin, ciprofloxacin, and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* model of infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 43, n. 3, p. 672-677, 1999.

LALONDE, R. L. Pharmacodynamics. In: EVANS, W.; SCHENTAG, J.; JUSKO, W. *Applied Pharmacokinetics – Principles of Therapeutic Drug Monitoring.* 3.ed. Vancouver: Applied Therapeutics Inc., 1992. Cap. 4. p. 1-33.

- LANGE, E. C. M.; BOER, A. G.; BREIMER, D. D. Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. *Adv. Drug Del. Rev.* v. 45, p. 125-148, 2000.
- LARSSON, C. I. The use of an "internal standard" for control of the recovery in microdialysis. *Life Sci.* v. 49, p. PL73-PL78, 1991.
- LEGAT, F. J.; MAIER, A.; DITTRICH, P.; ZENAHLIK, P.; KERN, T.; NUHSBAUMER, S.; FROSSARD, M.; SALMHOFER, W.; KERL, H.; MÜLLER, M. Penetration of fosfomycin into inflammatory lesions in patients with cellulitis or diabetic foot syndrome. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 47, n. 1, p. 371-374, 2003.
- LEGGETT, J. E.; FANTIN, B.; EBERT, S.; TOTSUKA, K.; VOGELMAN, B.; CALAME, W.; MATTIE, H.; CRAIG, W. A. Comparative antibiotic dose-effect relations at several dosing intervals in murine pneumonitis and thigh-infection models. *J. Infect. Dis.* v. 159, p. 281-292, 1989.
- LEVINE, J. M.; NOECKER, R. J.; LANE, L. C.; HERRYGERS, L.; NIX, D.; SNYDER, R. W. Comparative penetration of moxifloxacin and gatifloxacin in rabbit aqueous humor after topical dosing. *J. Cataract Refract. Surg.* v. 30, p. 2177-2182, 2004.
- LIDMAN, C.; BURMAN, L. G.; LAGERGREN, A.; ORTQVIST, A. Limited value of routine microbiological diagnostics in patients hospitalized for community-acquired pneumonia. *Scand. J Infect. Dis.* v. 34, p. 873-879, 2002.
- LISTER, P. D.; SANDERS, C. C. Pharmacodynamics of levofloxacin and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 43, p. 79-86, 1999a.
- LISTER, P. D.; SANDERS, C. C. Pharmacodynamics of trovafloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. In an *in vitro* pharmacokinetic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 43, n. 5, p. 1118-1123, 1999b.
- LISTER, P. D. Pharmacodynamics of gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* pharmacokinetic model: impact of area under the curve/MIC ratios on eradication. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 46, n. 1, p. 69-74, 2002a.
- LISTER, P. D. Pharmacodynamics of 750 mg and 500 mg doses of levofloxacin against ciprofloxacin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn. Microb. Infect. Dis.* v. 44, p. 43-49, 2002b.
- LIU, P.; MÜLLER, M.; GRANT, M.; WEBB, A. I.; OBERMANN, B.; DERENDORF, H. Interstitial tissue concentrations of cefpodoxime. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 50, p. 19-22, 2002.
- LIU, P.; DERENDORF, H. Antimicrobial tissue concentrations. *Infect Dis. Clin. N. A.* v. 17, p. 599-613, 2003.
- LIU, P.; RAND, K. H.; OBERMANN, B.; DERENDORF, H. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of antibacterial activity of cefpodoxime and cefixime in *in vitro* kinetic models. *Int. J. Antimicrob. Agents.* v. 25, p. 125-129, 2005.
- LÖNNROTH, P.; JANSSON, P. A.; SMITH, U. A. A microdialysis method allowing characterization of intracellular water space in humans. *Am. J. Physiol.* v. 253, p. 228-231, 1987.

LORENTZEN, H.; KALLEHAVE, F.; KOLMOS, H. J.; KNIGGE, U.; BULOW, J.; GOTTRUP, F. Gentamicin concentrations in human subcutaneous tissue. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 40, n. 8, p. 1785-1789, 1996.

LOW, D. E.; AZAVEDO, J.; WEISS, K.; MAZZULLI, T.; KUHN, M.; CHURCH, D.; FORWARD, K.; ZHANEL, G.; SIMOR, A.; MCGEER, A. Antimicrobial Resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Canada during 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 46, n. 5, p. 1295-1301, 2002.

LUBASCH, A.; KELLER, I.; BORNER, K.; KOEPPE, P.; LODE, H. Comparative pharmacokinetics of ciprofloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, trovafloxacin, and moxifloxacin after single oral administration in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 44, n. 10, p. 2600-2603, 2000.

MACGOWAN, A. P.; ROGERS, C. A.; HOLT, H. A.; WOOTON, M.; BOWKER, K. E. Pharmacodynamics of gemifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* pharmacokinetic model of infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 45, n. 10, p. 2916-2921, 2001.

MADARAS-KELLY, K. J.; OSTERGAARD, B. E.; HOVDE, L. B.; ROTSHAFER, J. C. Twenty-four-hour area under the concentration-time curve/MIC ratio as a generic predictor of fluoroquinolone antimicrobial effect by using three strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 40, n. 3, p. 627-632, 1996.

MADARAS-KELLY, K. J.; DEMASTERS, T. A. *In vitro* characterization of fluoroquinolone concentration/MIC antimicrobial activity and resistance while simulating clinical pharmacokinetics of levofloxacin, ofloxacin, or ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* v. 37, n. 4, p. 253-260, 2000.

MANDELL, L. A.; BARTLETT, J. G.; DOWELL, S. F.; FILE T. M. Jr.; MUSER, D. M.; WHITNEY, C. Update of practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. *Clin. Infect Dis.* v. 37, p. 1405-1433, 2003.

MARCHAND, S.; DAHYOT, C.; LAMARCHE, I.; MIMOZ, O.; COUET, W. Microdialysis study of imipenem distribution in skeletal muscle and lung extracellular fluids on no infected rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 49, n. 6, p. 2356-2361, 2005.

MARRIE, T. J. Pneumococcal pneumonia: epidemiology and clinical features. *Semin. Respir. Infect.* v. 14, p. 227-236, 1999.

MATHER, R.; KARENCHAK, L. M.; ROMANOWSKI, E. G.; KOWALSKI, R. P. Fourth generation fluoroquinolones: new weapons in the arsenal of ophthalmic antibiotics. *Am. J. Ophthalmol.* v. 133, n. 1, p. 463-466, 2002.

MATTOES, H. M.; BANEVICIUS, M.; LI, D.; TURLEY, C.; XUAN, D.; NIGHTINGALE, C. H.; NICOLAU, D. P. Pharmacodynamic assessment of gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 45, n. 7, p. 2092-2097, 2001.

MEIBOHM, B.; DERENDORF, H. Basic concepts of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* v. 35, n. 10, p. 401-413, 1997.

MILATOVIĆ, D.; SCHMITZ, F.; BRISSE, S.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. In vitro activities of sitafloxacin (DU-6859A) and six other fluoroquinolones against 8,796 clinical bacterial isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 44, n. 4, p. 1102-1107, 2000.

MOROSINI, M.; CANTÓN, R.; LOZA, E.; NEGRI, M.; GALÁN, J.; ALMARAZ, F.; BAQUERO, F. In vitro activity of telithromycin against spanish *Streptococcus pneumoniae* isolates with characterized macrolide resistance mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 45, n. 9, 2427-2431, 2001.

MOUTON, J. W.; VINKS, A. A. T. M. M.; PUNT, N. C. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 41, n. 4, p. 733-738, 1997.

MOUTON, J. W.; DUDLEY, M. N.; CARS, O.; DERENDORF, H.; DRUSANO, G. L. Standardization of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 55, p. 601-607, 2005.

MÜLLER, J. L. Oral and i.v. formulations of gatifloxacin cleared for U.S. market. *Am. J. Health Sys. Pharm.* v. 57, n. 3, p. 204-205, 2000.

MÜLLER, M.; HAAG, O.; BURGDORFF, T.; GEORGOPOULOS, A.; WENINGER, W.; JANSEN, B.; STANCK, G.; PEHAMBERGER, H.; AGNETER, E.; EICHLER, H. G. Characterization of peripheral-compartment kinetics of antibiotics by *in vivo* microdialysis in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 40, n. 12, p. 2703-2709, 1996.

MÜLLER, M.; MADER, R. M.; STEINER, B.; STEGER, G. G.; JANSEN, B.; GNANT, M. 5-fluorouracil kinetics in the interstitial tumor space clinical response in breast cancer patients. *Cancer Res.* v. 57, p. 2598-2601, 1997a.

MÜLLER, M.; ROHDE, B.; KOVAR, A.; GEORGOPOULOS, A.; EICHLER, H. G.; DERENDORF, H. Relationship between serum and free interstitial concentrations of cefodizime and cefpirome in muscle and subcutaneous adipose tissue of healthy volunteers measured by microdialysis. *J. Clin. Pharmacol.* v. 37, p. 1108-1113, 1997b.

MÜLLER, M.; STASS, H.; BRUNNER, M.; MOLLER, J. G.; LACKNER, E.; EICHLER, H. G. Penetration of moxifloxacin into peripheral compartments in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 43, n. 10, p. 2345-2349, 1999.

MÜLLER, M. Science, medicine, and the future microdialysis. *Brit. Medical J.* v. 321, n. 9, p. 588-591, 2002.

NAKASHIMA, M.; UEMATSU, T.; KOSUGE, K.; KUSAJIMA, H.; OOIE, T.; MASUDA, Y.; ISHIDA, R.; UCHIDA, H. Single and multiple-dose pharmacokinetics of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone, in human. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 39, n. 12, p. 2635-2640, 1995.

NG, W.; LUTSAR, I.; WUBBEL, L.; GHAFFAR, F.; JAFRI, H.; MCCRACKEN, G. H.; FRIEDLAND, I. R. Pharmacodynamics of trovafloxacin in a mouse model of cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* pneumonia. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 43, p. 811-816, 1999.

NIEDERMAN, M. S.; MANDELL, L. A.; ANZUETO, A. *et al.*, Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of

- severity, antimicrobial therapy, and prevention. *Am. J Respir. Crit. Care Med.* v. 163, p. 1730-1754, 2001.
- NIGHTINGALE, C. H.; MURAKAWA, T. *Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002.
- NOLTING, A.; DALLA COSTA, T.; RAND, K. H.; DERENDORF, H. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of the antibiotic effect of piperacillin *in vitro*. *Pharm. Res.* v. 13, n. 1, p. 91-96, 1996.
- ODENHOLT, I.; CARS, O. Pharmacodynamics of moxifloxacin and levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*: simulation of human plasma concentrations after intravenous dosage in an *in vitro* kinetic model. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 58, p. 960-965, 2006.
- ODLAND, B. A.; JONES, R. N.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.; BEACH, M. L. Antimicrobial activity of gatifloxacin (AM-1155, CG-5501), and four other fluoroquinolones tested against 2,284 recent clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Europe, Latin America, Canada, and the United States. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* v. 34, p. 315-320, 1999.
- O'DONNELL, I. A.; GELONE, S. P. Fluoroquinolones. *Infect. Dis. Clin. North Am.* v. 14, n. 2, p. 489-493, 2000.
- OKAZAKI, O.; KOJIMA, C.; HAKUSUI, H.; NAKASHIMA, M. Enantioselective disposition of ofloxacin in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 35, n. 10, p. 2106-09, 1991.
- ONYEJI, C. O.; BUI, K. Q.; OWENS, R. C.; NICOLAU, D. P.; QUINTILIANI, R.; NIGHTINGALE, C. H. Comparative efficacies of levofloxacin and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in a mouse model of experimental septicaemia. *Int. J. Antimicrob. Agents.* v. 12, 107-114, 1999.
- OWENS, R. C.; AMBROSE, P. G. Clinical use of fluoroquinolones. *Med. Clin. North Am.*, v. 84, p. 1447-1469, 2000.
- PALMA, E. C. Modelagem PK/PD do efeito bactericida do norfloxacin contra diferentes microrganismos. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Dissertação de Mestrado, 2003, 110 p.
- PERRY, C. M.; BALFOUR, J. A. B.; LAMB, H. M. Gatifloxacin. *Drugs.* v. 58, p. 682-696, 1999.
- PETERS, J. L.; YANG, H.; MICHAEL, A. C. Quantitative aspects of brain microdialysis. *Anal. Chim. Acta.* v. 412, p. 1-12, 2000.
- PFALLER, M. A.; EHRHARDT, A. F.; JONES, R. N. Frequency of pathogen occurrence and antimicrobial susceptibility among community-acquired respiratory tract infections in the respiratory surveillance program study: microbiology from the medical office practice environment. *Am. J. Med.*, v. 111 (9A), 4S-12S, 2001.
- PICKERILL, K. E.; PALADINO, J. A.; SCHENTAG, J. J. Comparison of the fluorquinolones based on pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Pharmacotherapy.* v. 20, n. 4, p. 417-428, 2000.

PIDDOCK, I. J.; JIN, Y. F.; RICCI, V.; ASUQUO, A. E. Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 43, p. 61-70, 1999.

PRESTON, S. L.; DRUSANO, G. L.; BERMAN, A. L.; FOWLER, C. L.; CHOW, A. T.; DORNSEIF, B.; REICHL, V.; NATARAJAN, J.; CORRADO, M. Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trials. *J. Am. Assoc.* v. 279, p. 125-129, 1998.

RARITAN, N. J. Levaquin (package insert). Ortho-McNeil Pharmaceutical Corporation; December 1996.

REINERT, R. R.; AL-LAHHAM, A.; LEMMEN, S.; LÜTTICKEN, R. *In vitro* activity of gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* isolates in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 46, p. 847-863, 2000.

RELLO, J; BODI, M; MARISCAL D. *et al.* Microbiological testing and outcome of patients with severe community-acquired pneumonia. *Chest* v. 123, p. 174-180, 2003.

REYES, H.; GUISCAFRE, H.; MUNOZ, O. *et al.* Antibiotic noncompliance and waste in upper respiratory infections and acute diarrhea. *J Clin Epidemiol.* v. 50, p. 1297-1304, 1997.

RODVOLD, K. A.; NEUHAUSER, M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Pharmacotherapy.* v. 21, n. 10, p. 233S-252S, 2001.

RODVOLD, K. A.; WHITE, R. L.; GUNDERSON, B. W. *et al.* Clinical relevance of pharmacodynamic studies. *Pharmacotherapy.* v. 21, p. 291S-330S, 2001.

RONALD, N. J.; JOHNSON, D. M.; ERWIN, M. E.; BEACH, M. L.; BIEDENBACH, D. J.; PFALLER, M. A. Comparative antimicrobial activity of gatifloxacin tested against *Streptococcus ssp.* including quality control guidelines and E-test method validation. *Diagn. Microb. Infect. Dis.* v. 34, p. 91-98, 1999.

ROUSSEAU, J. Quels avantages apportent les nouvelles quinolones? *Québec Pharmacie.* v. 49, n. 9, p. 778-781, 2002.

SAELAND, E.; VIDARSSON, G.; JONSDOTTIR, I. Pneumococcal pneumonia and bacteremia model in mice for the analysis of protective antibodies. *Microb. Pathog.* v. 29, p. 81-91, 2000.

SARAVOLATZ, L. D.; LEGGETT, J. Gatifloxacin, gemifloxacin, and moxifloxacin: the role of 3 newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* v. 37, p. 1210-1215, 2003.

SCHENTAG, J. J. Comparisons of pharmacokinetic parameters to efficacy of antibiotics: relationships between tissue concentrations, MIC values and bacterial eradication in patients with Gram-negative pneumonia. *Scand. J. Infect. Dis. Supplement.* 74, p. 218-234, 1991.

SCHENTAG, J. J.; NIX, D. E.; ADELMAN, M. H. Mathematical examination of dual individualization principles (1): Relationships between AUC above MIC and area under the inhibitory curve for cefmenoxime, ciprofloxacin, and tobramycin. DICP. *The Ann. Pharmacother.* v. 25, p. 1050-1057, 1991.

SCHEYER, R. D.; DURING, M. J.; SPENCER, D. D.; CRAMER, J. A.; MATTSON, R. H. Measurement of carbamazepina and carbamazepina epoxide in the human brain using *in vivo* microdialysis. *Neurology*. v. 44, p. 1469-1472, 1994.

SCHIMITZ, F. J.; HIGGINS, P. G.; MAYER, S.; FLUIT, A. C.; DALHOFF, A. Activity of quinolones against gram-positive cocci: mechanisms of drug action and bacterial resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis*. v. 21, p. 647-659, 2002.

SCHRAG, S. J.; PENA, C.; FERNANDEZ, J. *et al.* Effect of short-course, high-dose amoxicillin therapy on resistant pneumococcal carriage: A randomized trial. *JAMA*. v. 286, p. 49-56, 2001.

SCHUCK, E. L.; DALHOFF, A.; DERENDORF, H. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) evaluation of a once-daily treatment using ciprofloxacin in an extended-release dosage form. *Infection*. v. 33, Supplement 2, p. 22-28, 2005.

SILVA, I. C. C.; PALOMBINI, B. C. Pneumonias Comunitárias. In: *Conduitas em Pneumologia*. Rio de Janeiro: Revinter, v. 1, 2001. Cap. 4., p. 367-387.

SOEJIMA, R.; SAITO, A. Efficacy of gatifloxacin in pneumococcal respiratory infection. *Drugs*. v. 58, Supplement 2, p. 280-281, 1999.

STAHL, M.; BOUW, R.; JACKSON, A.; PAY, V. Human microdialysis. *Curr. Pharmacol. Biotechnol*. v. 3, n. 2, p. 165-178, 2002.

STAHLBERG, H. J.; GUILLAUME, M.; MIGNOT, A. Single dose pharmacokinetics of the R- and S- enantiomers of gatifloxacin in volunteers. *Drugs*. v. 58, Supplement 2, p. 222-224, 1999.

TEGEDER, I.; SCHMIDTKO, A.; BRÄUTIGAM, L.; KIRSCHBAUM, A.; GEISSLINGER, G.; LÖTSCH, J. Tissue distribution of imipenem in critically ill patients. *Clin. Pharmacol. Ther*. v. 71, n. 5, p. 325-333, 2002.

The Merck Index. 13TH Ed. Rahay, N. J.: Merck, 2001.

TOMASELLI, F.; DITTRICH, P.; MAIER, A.; WOLTSCHKE, M.; MATZI, V.; PINTER, J.; NUBSBAUMER, S.; PINTER, H.; SMOLLE, J.; SMOLLE-JÜTTNER, F. M. Penetration of piperacillin and tazobactam into pneumonic human lung tissue measured by *in vivo* microdialysis. *Br. J. Clin. Pharmacol*. v. 55, p. 620-624, 2003.

TOMASELLI, F.; MAIER, A.; MATZI, VERONIKA, SMOLLE-JÜTTNER, F. M.; DITTRICH, P. Penetration of meropenem into pneumonic human lung tissue as measured by *in vivo* microdialysis. *Antimicrob. Agents Chemother*. v. 48, n. 6, p. 2228-2232, 2004.

TRAMPUZ, A.; LAIFER, G.; WENK, M.; RAJACIC Z.; ZIMMERLI, W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in a granulocyte-rich exudate. *Antimicrob. Agents Chemother*. v. 46, n. 11, p. 3630-3633, 2002.

UNGERSTEDT, U., Microdialysis – principles and applications for studies in animals and man. *J. Intern. Med*. v. 230, p. 365-373, 1991.

VALCKE, Y.; PAUWELS, R.; VAN DER STRAETEN, M. The penetration of aminoglycosides into the alveolar lining fluid of rats. The effect of airway inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* v. 142, p. 1099-1103, 1990.

VIRGÍLIO, T. Conduas nas Pneumonias Comunitárias do Adulto. *Acta Médica, Porto Alegre*, 20, p. 396-406, 1999.

WIMER, S. M.; GARRISON, M. W. Levofloxacin: a therapeutic review. *Clin. Therap.* v. 20, n. 6, p. 1049-70, 1998.

WISE, R.; ANDREWS, J. M.; ASHBY, J. P.; MARSHALL, J. A study to determine the pharmacokinetics and inflammatory fluid penetration of gatifloxacin following a single oral dose. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 44, p. 701-704, 1999.

WOODNUT, G. Pharmacodynamics to combat resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 46, p. 25-31, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Web site. Overcoming antimicrobial resistance: World Health Organization Report on Infectious Diseases 2000. WHO/CDS/2000.2.2000. Geneva, Switzerland: WHO; 2000. Disponível em: <<http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/intro.html>>. Acesso em 15 de junho de 2007.

ZEITLINGER, M. A.; DEGHANYAR, P.; MAYER, B. X.; SCHENK, B. S.; NECKEL, U.; HEINZ, G.; GEORGOPOULOS, A.; MÜLLER, M.; JOUKHADAR, C. Relevance of soft-tissue penetration by levofloxacin for target site bacterial killing in patients with sepsis. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 47, n. 11, p. 3548-3553, 2003.

ZEITLINGER, M.; MÜLLER, M.; JOUKHADAR, C. Lung Microdialysis – A powerful tool for the determination of exogenous and endogenous compounds in the lower respiratory tract (mini-review). *The AAPS J.* v. 7, n. 3, p. E600-E608, 2005.

ZHANEL, G. G.; ENNIS, K.; VERCAIGNE, L. *et al.* A critical review of the fluorquinolones: Focus on respiratory infections [published correction appears in *Drugs*. 2002; 62:944]. *Drugs.* v. 62, p. 13-59, 2002.

ZHANEL, G. G.; NOREDDIN, A. M.; Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new fluoroquinolones: focus on respiratory infections. *Clin Opin Pharmacol.* v. 1, p. 459-463, 2001.

CAPÍTULO 3: High performance liquid chromatography for quantification of gatifloxacin in rat plasma following automated on-line solid phase extraction

Artigo publicado no *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44 (2007) 205-210.

CAPÍTULO 4: Pharmacokinetic plasma profile and bioavailability evaluation of gatifloxacin in rats

Artigo publicado no *Latin American Journal of Pharmacy* (formerly *Acta Farmaceutica Bonaerense*) 27 (2): 270-273 (2008)

CAPÍTULO 5: Evaluation of gatifloxacin penetration into skeletal muscle and lung by microdialysis in rats

Artigo in press no International Journal of Pharmaceutics, 2008.

CAPÍTULO 6: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic modeling of levofloxacin and gatifloxacin bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* recurrent in Community-acquired pneumonia

Artigo submetido ao Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008.

**Pharmacokinetic/Pharmacodynamic modeling of levofloxacin and gatifloxacin
bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* recurrent in
Community-acquired pneumonia**

¹Tasso, Leandro, ²de Andrade, Cristiane, ^{1,2} Dalla Costa, Teresa *

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, ²Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

***Corresponding author**

Teresa Dalla Costa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Av. Ipiranga, 2752
Porto Alegre, RS
90.610-000 - Brazil
Phone: +55-51-3308-5418
Fax: +55-51-3308-5437
E-mail: teresadc@farmacia.ufrgs.br

1 **Synopsis**

2

3 **Objective:** The aim of this work was to pharmacologically compare levofloxacin and
4 gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae*, common bacteria in community-acquired
5 pneumonia, by PK/PD modeling the time-kill curves obtained using an *in vitro* infection
6 model.

7

8 **Methods:** An *in vitro* infection model was used to simulate free pulmonary fluctuating
9 concentrations expected after multiple dosing regimens of both drugs in human or constant
10 concentrations multiples of MIC against *Streptococcus pneumoniae*. An E_{max} model was
11 employed to fit the time-kill curves obtained using Scientist[®]. The PK/PD parameters and the
12 PK/PD indices of the dosing regimens simulated were compared.

13

14 **Results:** Levofloxacin EC_{50} (3.57 ± 2.16 mg/L) was higher than gatifloxacin (0.95 ± 0.56
15 mg/L) when multiple dosing regimens were simulated. The same was observed when
16 constant concentrations were simulated ($EC_{50,levofloxacin} = 2.75 \pm 0.45$ mg/L; $EC_{50,gatifloxacin} =$
17 1.03 ± 0.52 mg/L). The k_{max} was statistically similar for both drugs independent of whether
18 fluctuating ($k_{max,levofloxacin} = 0.40 \pm 0.19$ h⁻¹; $k_{max,gatifloxacin} = 0.48 \pm 0.15$ h⁻¹) or constant
19 concentrations ($k_{max,levofloxacin} = 0.34 \pm 0.06$ h⁻¹; $k_{max,gatifloxacin} = 0.39 \pm 0.23$ h⁻¹) were simulated.
20 None of the PK/PD indices was capable of predicting the infection outcome for all the
21 situations investigated.

22

23 **Conclusions:** The PK/PD model was able to describe the effect of levofloxacin and
24 gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae in vitro* for all the simulations investigated.
25 Gatifloxacin was more potent than levofloxacin but both presented equivalent efficacy. The
26 PK/PD indices were not able to predict or compare the different regimens outcome observed.
27 The model can be used for simulating alternative regimens and optimizing therapy to treat
28 community-acquired pneumonia.

29 Introduction

30

31 Community-acquired respiratory tract infections including community-acquired
32 pneumonia (CAP) are prevalent conditions and constitute a substantial socio-economic
33 burden. Although improvements in antibiotic and supporting treatment have occurred in the
34 past years, CAP is an increasingly common reason for hospital admission¹ and still remains
35 a major cause of both mortality and morbidity worldwide. Several factors, including extremes
36 of age and co-morbidity, contribute to its high mortality risk.^{2,3}

37 Despite the emergence of newly identified pathogens related to CAP, *Streptococcus*
38 *pneumoniae* remains the most common etiologic agent.^{4,5} Respiratory fluoroquinolones such
39 as levofloxacin and gatifloxacin are effective antimicrobial agents indicated for the treatment
40 of lower respiratory infection, particularly CAP.⁶ Levofloxacin (3rd generation) and gatifloxacin
41 (4th generation) are also used for the treatment of chronic bronchitis; sinus, urinary tract,
42 kidney and skin infections.^{7,8} Both drugs have a broad-spectrum of antimicrobial activity
43 against gram-negative as well as gram-positive pathogens.⁹

44 Antimicrobial agents are evaluated based on pharmacokinetic-pharmacodynamic
45 (PK/PD) indices, which are direct ratios between antimicrobials pharmacokinetic parameters
46 and their minimum inhibitory concentrations (MIC). Using PK/PD indices, antimicrobial
47 activity can be classified as time-dependent, when the time-span (T) of bacteria exposure to
48 drug concentrations exceeding MIC ($T > MIC$) is the most relevant index to predict infection
49 outcome, or concentration-dependent, when the ratio between antimicrobial free peak
50 plasma level (fC_{max}) and MIC (fC_{max}/MIC) or the ratio between area under the free plasma
51 concentration time curve ($fAUC$) and MIC ($fAUC/MIC$) better forecast bacteria eradication.¹⁰
52 Although both fC_{max}/MIC and $fAUC_{0-24h}/MIC$ correlate with successful therapeutic outcomes
53 for fluoroquinolones, studies advocate that the $fAUC_{0-24h}/MIC$ ratio is the best index to predict
54 fluoroquinolones therapeutic outcome.^{11,12} Data from *in vitro*, animal and clinical studies
55 suggest that an $fAUC_{0-24h}/MIC$ between 25 to 34 is fluoroquinolones target ratio to warrant
56 bacterial eradication in CAP caused by *Streptococcus pneumoniae*.¹³ Other authors,

57 however, suggest that for community-acquired pneumonia due to this bacteria an $fAUC_{0-}$
58 $_{24h}/MIC$ ratio ≥ 30 are predictive of infection outcome.¹⁴⁻¹⁹

59 Even though the MIC is a good pharmacodynamic parameter to describe drugs
60 antibacterial potency, it is a threshold concentration with poor precision, determined under
61 static *in vitro* conditions in a setting that hardly reflects the dynamic situation encountered at
62 the *in vivo* infection site. *In vivo*, bacteria are exposed to fluctuating peak and trough
63 concentrations and the antibacterial activity is a result of a dynamic concentration- and time-
64 dependent process.²⁰ The PK/PD indices which use the MIC, consequently, are limited by
65 the same boundaries. Furthermore, the PK/PD indices define target value that ensure
66 bacteria eradication, not allowing for comparisons between different dosing regimens of the
67 same drug, efficacy comparison of different drugs used to treat the same infection or
68 outcome prediction for alternative regimens.

69 Aiming to overcome these limitations, PK/PD modeling is becoming a powerful tool to
70 evaluate the pharmacological activity of antimicrobial agents. In this approach, the
71 pharmacodynamic effect determined in time-kill experiments, conducted *in vitro* exposing
72 bacteria to fluctuating concentrations mimicking the drug half-life observed *in vivo*, is
73 modeled taking into consideration the pharmacokinetics of the antimicrobial at the infection
74 site. As a result, a mathematical description of the antimicrobial effect-time profile is obtained
75 and pharmacologically meaningful parameters such as the maximum effect (maximum killing
76 rate) and concentration necessary to produce maximum effect are derived. These
77 parameters allow not only to describe the antibacterial behavior of the drug under
78 investigation but also to compare drugs of the same class for treating a specific infection as
79 well as to simulate the effect over time of alternative regimens.

80 Considering that most infections happen in peripheral tissues or organs and not in the
81 blood stream and that only free concentrations exhibit pharmacological effect, antimicrobial
82 free tissue levels should be used in PK/PD modeling. In general, fluoroquinolones have
83 extensive tissues penetration showing $AUC_{free,tissue}/AUC_{free,plasma}$ ratios close to 1.
84 Levofloxacin showed ratios between 0.85 in skeletal muscle²¹ and 1.1 in subcutaneous

85 adipose tissue²² in humans. Free pulmonary concentrations of levofloxacin have been
86 determined by microdialysis in healthy individuals after cardiac surgery.²³ Using the data
87 presented in this paper, levofloxacin estimated pulmonary penetration was determined to be
88 0.82. Our group previously demonstrated that gatifloxacin easily penetrates into pulmonary
89 Wistar rat tissue.²⁴ Free pulmonary levels of the drug could be predicted using PK
90 parameters derived from total plasma concentrations and were similar to free plasma levels.
91 The lung penetration factor was found to be 1.08.

92 It was the purpose of this study to pharmacologically compare levofloxacin and
93 gatifloxacin effect against *Streptococcus pneumoniae* by PK/PD modeling the time-kill curves
94 obtained using an *in vitro* experimental infection model where the expected lung free levels
95 of both drugs following different dosing regimens in humans were simulated.

96

97 **Materials and Methods**

98

99 *Bacterial strains and bacterial growth media*

100 *Streptococcus pneumoniae* ATCC[®] 49619 was kept frozen at - 70 °C in sterile skin
101 milk (Acumedia[®], Michigan, USA) with a drop of sheep sterile blood. For the experiments, the
102 strain was transferred to Mueller-Hinton agar plate supplemented with 5% sheep blood
103 (McBarth, Porto Alegre, Brazil) and it was incubated for 18-24 hours at 35 ± 1 °C in a CO₂
104 atmosphere. For the inoculum preparation, isolated colonies were resuspended in sterile
105 saline to reach a turbidity equivalent to on 0.5 McFarland (10⁸ Colony Forming Units/milliliter
106 - CFU/mL) scale.

107

108 *Antimicrobials and susceptibility testing*

109 Levofloxacin (99.7%) was donated by Cristalia[®] (São Paulo, Brazil) and gatifloxacin
110 (100%) was donated by Bristol-Myers Squibb (São Paulo, Brazil). The MIC of levofloxacin
111 and gatifloxacin were determined in triplicate using the broth macrodilution method according
112 to procedures outlined by the Clinical and Laboratory Standards Institute²⁵. The MIC was

113 defined as the lowest concentration of drug that inhibited visible macroscopic growth of an
114 inoculum of approximately 10^5 CFU/mL after an appropriate incubation period (18-24 h) at 35
115 ± 1 °C in a CO₂ atmosphere.

116

117 *In vitro model of infection*

118 A simple one-compartment *in vitro* model of infection was used to study the
119 pharmacodynamic effect of levofloxacin and gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae*
120 following administration of multiple intermittent dosing of the drugs or constant
121 concentrations. The *in vitro* model consisted of a 50 mL culture flask containing 20 mL of
122 Todd-Hewitt Broth (Difco™). The medium was prepared according to the manufacturer's
123 instructions and autoclaved at 121 °C prior to use. A syringe connected to a sterile 0.22 μ m
124 filter was adapted to the upper side of the flask to allow for the withdrawal and replacement
125 of broth solution for the simulation of decreasing concentrations at fixed time intervals.
126 Bacterial count was kept unchanged in the medium because the broth was both withdrawn
127 and added through the filter. An aliquot of 100 μ L of the *Streptococcus pneumoniae*
128 suspension (10^8 CFU/mL) prepared as described previously was added to the system to
129 achieve a consistent starting inoculum of approximately 5×10^5 CFU/mL.

130 To ensure that bacteria were in the logarithmic growth phase prior to antimicrobial
131 exposure, experiments were previously performed to determine the lag time between
132 inoculation and drug addition to the model. After 2 h incubation, a time zero sample was
133 taken and the drug was added to the flask. Bacteria were exposed to different initial
134 concentrations of both fluoroquinolones corresponding to the expected drugs free peak
135 levels in pulmonary tissue after administration of different dosing regimens to humans. In
136 order to reproduce the half-life of each drug, a stepwise dilution procedure was followed. At
137 30 min intervals, aliquots of the experimental media containing the drugs were withdrawn
138 and replaced by drug-free sterile broth solution at 35 ± 1 °C during 24 h of experiment. In
139 another set of experiments, bacteria were exposed to different constant concentrations of
140 both drugs and the kill curves were built up to 12 h.

141 To assess bacterial density over time, samples were collected from each set of
142 experiment every 2 h up to the end of the experiment and serially 10-fold diluted in sterile
143 normal saline. Two experiments were followed up to 4 h collecting samples every 30 min
144 (levofloxacin 1000 mg q24h and gatifloxacin 200 mg q24h). Aliquots of each diluted sample
145 were plated in duplicate for quantitative culture. The volume of aliquots used for bacterial
146 counts was either 20 or 100 μL , depending on the dilution used. All experiments were
147 conducted in triplicate. Together with each treatment one control experiment was carried out
148 to assure bacteria growth in the *in vitro* model in the absence of the antimicrobials.

149 After 18-24 h incubation in Mueller-Hinton agar plates supplemented with 5% sheep
150 blood (McBarth, Porto Alegre, Brazil) at 35 ± 1 °C with CO_2 atmosphere, the number of
151 CFU/mL in the samples was determined. The number of colonies in each microdilution at
152 each time point was determined by averaging the counts obtained from triplicate
153 experiments. The lowest level of detection was 200 CFU/mL. Time-kill curves were
154 constructed by plotting \log_{10} CFU/mL against time. Logarithmic reductions in bacterial counts
155 were determined by subtracting 24 h CFU/mL values from the starting inoculum.

156

157 *Pharmacokinetics of the fluoroquinolones in the in vitro infection model*

158 In order to simulate the pharmacokinetics of levofloxacin and gatifloxacin in the *in*
159 *vitro* infection model, the drugs were added to the experimental flask aiming to reach the free
160 pulmonary peak concentration (fC_{max}) expected for each drug regimen simulated.

161 Levofloxacin expected free concentrations in lung were calculated based on the
162 experiments conducted by Hutschala *et al.*²³ using microdialysis in patients who received
163 conventional 500 mg once-daily dosing of the drug. The free lung levels of levofloxacin in this
164 study showed elimination following two slopes, with 30 min and 7 h half-lives, respectively. In
165 order to simulate this elimination profile *in vitro*, in the first step-dilution 10 mL of media
166 were withdrawn and replaced by fresh broth. In the following steps, 0.97 mL of the medium
167 was exchanged by fresh broth.

168 Levofloxacin free levels in the *in vitro* infection model were described by Equation 1:

169

170

$$C = a \cdot e^{-\alpha \cdot t} + b \cdot e^{-\beta \cdot t} \quad \text{Eq. 1}$$

171

172 where C is the expected free lung concentration in humans at any time t; a and b are the

173 intercepts for the first and second elimination rates, respectively; α and β are the constant

174 rates representing the first and the second elimination, respectively. The values of the hybrid

175 constants a, b, α and β were calculated based on the free pulmonary data reported for the

176 500 mg dose²³. Assuming linear pharmacokinetics, peak levels for the other dosing regimens

177 were calculated.

178 Gatifloxacin free peak pulmonary levels in humans were assumed to be similar to free

179 plasma levels, based on the drug tissue penetration experiments conducted by our group²⁴

180 and were determined using plasma concentrations reported by Zhang *et al.*²⁶ corrected by a

181 protein binding of 20%.²⁷ An elimination half-life of 7.5 h was simulated for gatifloxacin in the

182 *in vitro* infection model by withdrawn and replacement of 0.95 mL of broth every 30 min.

183 Gatifloxacin free levels in the *in vitro* infection model were described by Equation 2:

184

185

$$C = C_{\max} \cdot e^{-ke \cdot t} \quad \text{Eq. 2}$$

186

187 where C is the expected free lung concentration in humans at any time t; C_{\max} is the peak

188 free concentration after dosing, and ke is the elimination rate constant.

189 The dosing regimens simulated and the corresponding free peak concentrations of

190 each drug added to the *in vitro* model are shown in Table 1. For each dosing regimen

191 simulated *in vitro*, the PK/PD indices calculated are also presented in Table 1. The AUC over

192 24 h for both fluoroquinolones were determined by trapezoidal rule.

193 For the experiments where constant concentrations were simulated, both drugs were

194 added to the infection model at levels corresponding to multiples of MIC (0.5, 1 and 2 times

195 the MIC) and kept constant through the experiments, conducted in triplicate. The same

196 procedures described for fluctuating concentrations were employed here to determine the
197 CFU/mL counts every two hours up to 12 h.

198

199 *Determination of antimicrobials concentration in the in vitro infection model*

200 In order to assure that the stepwise dilutions used in the *in vitro* infection model
201 closely resemble the elimination kinetics of both drugs expected in humans, samples of broth
202 taken from each one of the treatments were assayed for levofloxacin or gatifloxacin,
203 respectively. A high-performance liquid chromatography method was developed and
204 validated to analyze these samples. The system employed a reversed-phase Shim-Pack
205 CLC-ODS column (Shimadzu®) and fluorescence detection (295 nm excitation wavelength
206 and 480 nm extinction wavelength). All chemicals and solvents were of HPLC or analytical
207 grade. The mobile phase consisted of 2.5 mM phosphoric
208 acid:methanol:acetonitrile:triethylamine (64.8:15:20:0.2, v/v/v/v) pumped at a flow rate of 1.0
209 mL/min. Proteins present in the 200 µL broth samples were precipitated with 600 µL of
210 methanol. Samples were vortexed, centrifuged (6800 x g, 21 °C, 12 min) and 40 µL of the
211 supernatants were injected in the Shimadzu® HPLC system. Levofloxacin was used as
212 internal standard when gatifloxacin was evaluated and vice-versa.

213 Levofloxacin assay was linear ($r \geq 0.9987$) over a concentration range of 0.25 to 6.0
214 mg/L. The intra and inter-assay precision for the 0.6, 1.5 and 4.5 mg/mL quality control
215 samples do not exceed 1.08%, 1.01%, and 0.48%; and 1.99%, 2.01%, and 3.23% of the CV,
216 respectively. Gatifloxacin assay was linear ($r \geq 0.9988$) over a concentration range of 0.15 to
217 3.0 mg/L. The intra and inter-day precision for the 0.4, 1.2 and 2.5 mg/mL quality control
218 samples do not exceed 2.06%, 1.35%, and 4.21%; and 1.1%, 0.57%, and 1.63% of the CV,
219 respectively.

220

221

222

223 *Pharmacodynamic data analysis*

224 The experimental mean effect for each dosing regimen investigated was fitted to an
225 E_{\max} model using the non-linear regression software Scientist[®] v. 2.01 (Micromath[®], Salt Lake
226 City, USA):

227

228
$$\frac{dN}{dt} = \left(K_0 - \frac{K_{\max} \cdot C}{EC_{50} + C} \right) \cdot N \quad \text{Eq. 3}$$

229

230 where dN/dt is the change in the number of bacteria as a function of time, k_0 (h^{-1}) is the
231 bacterial growth rate constant in the absence of antibiotic, k_{\max} (h^{-1}) is the maximum killing
232 rate constant (maximum effect), EC_{50} (mg/L) is the concentration of antimicrobial necessary
233 to produce 50% of the maximum effect, C (mg/L) is the concentration of drug at any time (t)
234 and N (CFU/mL) is the number of viable bacteria at the beginning of the experiment
235 (inoculum). For the experiments simulating fluctuating levofloxacin free pulmonary levels, the
236 term C was replaced by equation 1, and in the experiments simulating free pulmonary
237 gatifloxacin levels, by equation 2. For the constant concentration simulations the term C was
238 kept constant at a level corresponding to each multiple of MIC investigated.

239 For the control experiment, without the drugs, bacterial growth was fitted to equation
240 4 in which the variation in the number of bacteria in the infection model (dN/dt) is a function
241 only of the bacterial growth rate constant (k_0) and the inoculum (N):

242

243
$$\frac{dN}{dt} = K_0 \cdot N \quad \text{Eq. 4}$$

244

245 The k_0 was determined by simultaneous fitting of all control experiments conducted.
246 When fitting the killing-curves, k_0 was fixed at $0.057 h^{-1}$, and the other parameters (EC_{50} and
247 k_{\max}) were estimated individually for each dosing regimen investigated.

248 The coefficient of determination (R^2) and the model selection criterion (MSC), given
249 by the software Scientist[®], as well as the correlation between observed and calculated values
250 were used as criteria for the goodness of fit. The higher the MSC, the more appropriate is the
251 selected model to describe the data. No weighting factor was used for fit all the data sets.

252 The PK/PD parameters determined by modeling the killing effect of both drugs were
253 compared by Student “t” test ($\alpha = 0.05$).

254

255 **Results**

256

257 The MIC for levofloxacin (1.0 mg/L) against *Streptococcus pneumoniae* ATCC[®]
258 49619 was two-fold that determined for gatifloxacin (0.5 mg/L), in agreement with previously
259 reported values.²⁵ The half-lives determined experimentally for levofloxacin (6.9 ± 0.1 h) and
260 gatifloxacin (7.4 ± 0.1 h) by quantifying the drugs in the *in vitro* model after stepwise dilution
261 were in agreement with the values simulated, confirming that the stepwise dilutions were
262 adequate to mimic the fluctuating free concentrations expected in lung for both drugs.

263 *Streptococcus pneumoniae* time-kill curves after multiple dosing are illustrated in
264 Figures 1 and 2 for levofloxacin and gatifloxacin, respectively. Figure 3 shows the time-kill
265 curves when constant concentrations were simulated. All levofloxacin multiple dose regimens
266 produced bacterial killing during the initial 8 h of treatment with different intensity depending
267 on the regimen investigated. For gatifloxacin, bacterial killing was observed during the initial
268 16 h following multiple dosing.

269 A 3-log reduction (99.9%) in the number of *Streptococcus pneumoniae* in the medium
270 was observed for all treatments simulated except for levofloxacin 250 mg q24h, 250 mg
271 q12h, and 500 mg q24h, and for gatifloxacin 50 mg q24h. For constant concentrations, a 3-
272 log reduction in CFU was observed for levofloxacin and gatifloxacin when concentrations
273 similar to MIC and 2 x MIC were evaluated.

274 The PK/PD parameters obtained by modeling levofloxacin and gatifloxacin
275 bactericidal effect to fluctuating and constant concentrations are presented in Tables 1 and 2,
276 respectively. The PK/PD indices calculated for each dosing regimen investigated for both
277 fluoroquinolones are also presented in Table 1.

278 It can be observed in Figures 1-3 that the PK/PD model adequately described both
279 fluoroquinolones antimicrobial effect with MSC values for the curve fitting bigger than 2.3.
280 The k_{max} determined for both drugs using different regimens was statistically similar ($\alpha =$
281 0.05) (Table 1 and 2). The EC_{50} determined for levofloxacin (3.57 ± 2.16 mg/L) was higher
282 than that determined for gatifloxacin (0.95 ± 0.56 mg/L) when multiple-dosing were simulated
283 *in vitro* (Table 1), as well as when constant concentrations were simulated (Table 2) where
284 $EC_{50,levofloxacin}$ was 2.75 ± 0.45 mg/L and $EC_{50,gatifloxacin}$ was 1.03 ± 0.52 mg/L. Independently of
285 the regimen investigated (constant or fluctuating concentration), the EC_{50} of each
286 fluoroquinolone was statistically similar ($\alpha = 0.05$).

287

288 Discussion

289 Traditionally, selection of drug and dosing regimen for antimicrobial therapy is based
290 on a static *in vitro* pharmacodynamic parameter, the MIC. *In vivo*, however, bacteria are
291 exposed to fluctuating antimicrobial concentrations, considering peaks and troughs after a
292 multiple dose regimen. The PK/PD modeling of the more realistic time-kill curves has the
293 advantage of describing the pharmacodynamic effect by parameters such as EC_{50} which
294 describes the potency of the drug, and k_{max} that represents drug efficacy, allowing for
295 comparison of drugs used to treat a particular infection, under similar experimental
296 conditions. The present study aimed to pharmacologically compare the fluoroquinolones
297 levofloxacin and gatifloxacin against a common pathogen of CAP, *Streptococcus*
298 *pneumoniae*, using the PK/PD modeling of the time-kill curves approach.

299 The results obtained by fitting the experimental data to the E_{max} model showed that
300 the model was adequate to describe the curves of antimicrobial effect for both drugs

301 independently of the dosing regimen investigated (Figures 1-3). The pharmacological effect
302 of other fluoroquinolones such as ciprofloxacin^{28,29} and norfloxacin³⁰ were already evaluated
303 by similar E_{max} models.

304 The comparison of the PK/PD average parameters obtained from the time-kill curves
305 fitting showed that both drugs were equally efficacious but gatifloxacin was more potent than
306 levofloxacin to treat *Streptococcus pneumoniae* infection when multiple-dose regimens or
307 constant concentrations multiples of MIC were simulated *in vitro* (Tables 1 and 2).

308 The pharmacodynamic effect of these quinolones can be viewed from a different
309 perspective. When contrasting both drugs dosing regimens with equivalent fC_{max}/MIC indices
310 one can reach a different conclusion. Comparing, for instance, the regimens that produced
311 fC_{max}/MIC close to 3 times the MIC for levofloxacin (250mg q12h or 250 mg q24h) and
312 gatifloxacin (200 mg q24h) one can observe that gatifloxacin effect was more pronounced,
313 showing bigger k_{max} values (Table 1, Figures 1 and 2). Similar behavior can be observed
314 when constant concentrations multiples of MIC were used. Comparing the time-kill curves for
315 the equipotent concentration of twice the MIC (Figure 3), for example, the number of CFU of
316 *Streptococcus pneumoniae* decreased faster for gatifloxacin than for levofloxacin, resulting in
317 a bigger k_{max} (Table 2). The same can be observed for the other concentrations investigated.
318 According to this observations, gatifloxacin seems to be more potent and efficacious than
319 levofloxacin to treat CAP produced by this bacteria strain.

320 The use of PK/PD indices to select the best dosing schedule for antimicrobial therapy
321 is still one of the main approaches in clinical practice. When levofloxacin was first approved
322 by FDA, the dosing regimen recommended was 500 mg q24h. Assuming that the $fAUC_{0-24h}/MIC$
323 index is the best predictor of the drug effect, fractionating the total daily dose should
324 not interfere with the final effect. In the same manner, if the fC_{max}/MIC were the best index,
325 500 mg once a day would be more effective. The results observed in Figure 1 for levofloxacin
326 167 mg q8h (A), 250 mg q12h (B) and 500 mg q24h (D) showed that reducing the dosing
327 interval had a significant impact on levofloxacin bactericidal activity, being the more frequent
328 administration, thrice a day, the more effective treatment simulated for a daily dose of 500

329 mg. These data could not be predicted or explained by anyone of the three PK/PD indices
330 because the $fAUC_{0-24h}/MIC$ was the same for all treatments (30 h), the fC_{max}/MIC was bigger
331 and the $T > MIC$ was longer for the single daily dose which was shown to be the less
332 effective of the three dosing regimens simulated. The explanation for this effect is unclear so
333 far.

334 When increasing the single daily dose of levofloxacin from 500 mg to 750 mg or to
335 1000 mg the drug was found to be more effective against *Streptococcus pneumoniae*, due to
336 higher exposures that resulted in $fAUC_{0-24h}/MIC$ of 45 and 60, respectively. These results
337 agree with those reported by Lister¹⁷ who suggested that when levofloxacin $fAUC_{0-24h}/MIC$
338 ratio falls below 30, the likelihood of bacteria eradication is diminished. Fractionating these
339 higher total daily doses resulted in less effective treatments as can be seen in the time-kill
340 curves after 375 mg q12h (Figure 1E) or 500 mg q12h (Figure 1G) as well as in the values of
341 k_{max} reported in Table 1, although a reduction > 3 -log CFU was observed for these regimens
342 in the time interval evaluated. In this case it seems that the fC_{max}/MIC index was a better
343 predictor of the infection outcome rather than $fAUC_{0-24h}/MIC$. Our findings corroborate those
344 obtained by Noreddin *et al.*³¹ that concluded that a daily dose of 750 mg of levofloxacin leads
345 to higher probability of pharmacodynamic target attainment and improved bacteriological
346 outcome against *Streptococcus pneumoniae* in patients with CAP, besides decreasing the
347 length of therapy.

348 Gatifloxacin recommended clinical dosing regimens are 200 or 400 mg daily dose.
349 The dose range evaluated in the present study was 50-400 mg/day. For the 400 mg daily
350 dose, the killing effect was so pronounced that it was not possible to count bacteria in the
351 model after 2 h of experiment (data not shown). The 50 mg q12h, 100 mg q24h and 200 mg
352 q24h dosing regimens simulated *in vitro* produced > 3 -log reduction in CFU in 24 hours
353 (Figure 2).

354 Gatifloxacin 50 mg q12h and 50 mg q24h, which are dosing regimens with peak
355 concentration of 0.35 mg/L, smaller than the drug MIC for *Streptococcus pneumoniae*,
356 produced CFU reduction for a period longer than 12 h (Figure 2). This suggests that

357 gatifloxacin sub-inhibitory concentrations produce a bactericidal effect and confirm that the
358 MIC is a threshold value that has to be view with care. For all regimens investigated but 200
359 mg q24h bacteria re-growth was observed by the end of the experimental period. The
360 effective 200 mg q24h and 400 mg q24h were the only gatifloxacin regimens with $fAUC_{0-24h}$ /
361 MIC close to or bigger than 30. In this context, our results support the recommended
362 gatifloxacin 200 or 400 mg q24h as regimens effective for *Streptococcus pneumoniae*
363 eradication and suggest that the $fAUC_{0-24h}/MIC$ ratio is a good predictor of the infection
364 outcome for this fluoroquinolone.

365 In the experiments where constant concentrations multiples of the MIC were
366 simulated the time-kill curves for both fluoroquinolones showed a large difference in the CFU
367 count after 12 h when comparing the effect of concentrations representing 0.5 x MIC and 1 x
368 MIC (Figure 3). While a concentration equivalent to half the MIC only slowed down bacteria
369 growing, concentrations similar to MIC or twice the MIC actually produced killing, with the
370 higher concentrations producing bacteria eradication after 6 or 8 h for gatifloxacin and
371 levofloxacin, respectively. Although gatifloxacin was apparently more efficacious and potent
372 when comparing both drug for the same MIC multiple, neither the EC_{50} nor the k_{max} were in
373 average statistically different ($\alpha = 0.05$). The comparison of these parameters with those
374 obtained for each drug after fluctuating concentrations were not statistically different either.
375 These results indicate that if these fluoroquinolones were used as constant rate infusion,
376 concentrations equivalent to twice the bacteria MIC would be effective.

377 One important limitation of the present approach is related to the fact that *in vitro*
378 experiments are usually performed in a milieu devoid of cells and humoral factors which
379 potentiate antimicrobial activity. Consequently, *in vitro* models may underestimate the overall
380 antimicrobial effect in an immunocompetent host. Even so, the results obtained using the *in*
381 *vitro* model to build the time-kill curves and subsequently modeling with an E_{max} PK-PD
382 model agreed with the results reported from clinical studies and allowed for a better
383 comparison of dosing regimens for these two fluoroquinolones. The results also indicate that
384 the target values of the PK/PD indices fC_{max}/MIC and $fAUC_{0-24h}/MIC$ can not be universally

385 applied to predict bacteria eradication for either one of the drugs investigated besides their
386 inability to serve as a guide to compare drugs in the same antimicrobial class.

387

388 **Conclusions**

389

390 The PK/PD E_{max} model employed adequately described levofloxacin and gatifloxacin
391 time-killing curves when fluctuating or constant concentration were simulated against
392 *Streptococcus pneumoniae* in an *in vitro* model of infection generating parameters that
393 allowed for the comparison of these fluoroquinolones potency and efficacy following different
394 dosing regimens. The model can be used for simulating regimens not investigated and for
395 optimizing both drugs regimens to treat Community-acquired pneumonia.

396

397 **Acknowledgements**

398 We thank Bristol Myers Squibb[®] and Cristalia[®] for supplying gatifloxacin and levofloxacin,
399 respectively.

400

401 **Funding**

402 This work was financially supported by CNPq/Brazil (Project # 473317/2004-4).

403

404 **Transparency declarations**

405 None to declare.

406

407

408

409

410

411

412

413 **References**

- 414 Woodhead M. *Community-acquired pneumonia*. In Horizons in Medicine 16 Edited by: Jayne
415 Franklin. London: Royal College of Physicians; 2004.
- 416
- 417 Colice GL, Morley MA, Asche C *et al*. Treatment costs of community-acquired pneumonia in
418 an employed population. *Chest* 2004; **125**: 2140-45.
- 419
- 420 Mandell LA, Bartlett JG, Dowel SF *et al*. Update of practice guidelines for the management of
421 community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. *Clin Infect Dis* 2003; **37**:1405-
422 33.
- 423
- 424 Iochimescu OC, Iochimescu AG, Iannini PB. Severity scoring in community-acquired
425 pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*: A 5-year experience. *Int J Antimicrob*
426 *Agents* 2004; **24**: 485-490.
- 427
- 428 File TM. Clinical implications and treatment of multiresistant *Streptococcus pneumoniae*
429 pneumonia. *Clin Microb Infection* 2006; **12** Suppl 3: 31-41.
- 430
- 431 File TM Jr. Antimicrobial therapy of community acquired pneumonia. *Infect Dis Clin North Am*
432 2004; **18**: 993-1016.
- 433 Wimer SM, Garrison MW. Levofloxacin: a therapeutic review. *Clin Ther* 1998; **20**: 1049-70.
- 434
- 435 Müller JL. Oral and i.v. formulations of gatifloxacin cleared for U.S. market. *Am J Health Sys*
436 *Pharm* 2000; **57**: 204-205.
- 437
- 438 Blondeau JM. Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clin Ther*
439 1999; **21**: 3-40.
- 440
- 441 Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing
442 of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998; **26**: 1-12.
- 443
- 444 Zhanel GG, Ennis K, Vercaigne L, *et al*. A critical review of the fluoroquinolones: focus on
445 respiratory infections. *Drugs* 2002; **62**: 13-59.
- 446
- 447 Zhanel GG, Noreddin AM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new
448 fluoroquinolones: Focus on respiratory infections. *Curr Opin Pharmacol* 2001; **1**: 459-63.

449 Ambrose PG, Grasela DM, Grasela TH *et al.* Pharmacodynamics of fluoroquinolones against
450 *Streptococcus pneumoniae* in patients with community-acquired respiratory tract infections.
451 *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2793-97.
452
453 Dalhoff A, Schmitz FJ: *In vitro* antibacterial activity and pharmacodynamics of new
454 quinolones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; **22**: 203-21.
455
456 Andes D, Anon J, Jacobs MR *et al.* Application of pharmacokinetics and pharmacodynamics
457 to antimicrobial therapy of respiratory tract infections. *Clin Lab Med* 2004; **24**: 477-02.
458
459 Ebisu H, Kishil R, Takei M *et al.* The effect of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD)
460 parameters of gatifloxacin on its activity and resistance selectivity against clinical isolates of
461 *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Chemother* 2003; **9**: 210-14.
462
463 Lister PD. Pharmacodynamics of gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an *in*
464 *vitro* pharmacokinetic model: Impact of area under the curve/MIC ratios on eradication.
465 *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 69-74.
466
467 Rodvold KA, Neuhauser M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones.
468 *Pharmacotherapy* 2001; **21**: 233S-52S.
469
470 Dudley MN, Ambrose PG. Pharmacodynamics in the study of drug resistance and
471 establishing *in vitro* susceptibility breakpoints ready for primetime. *Curr Opin Microbiol* 2000;
472 **3**: 515-21.
473
474 Liu P, Rand KH, Obermann B *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of
475 antibacterial activity of cefpodoxime and cefixime in *in vitro* kinetic models. *Int J Antimicrob*
476 *Agents* 2005; **25**: 125-29.
477
478 Zeitlinger MA, Dehghanyar P, Mayer BX *et al.* Relevance of soft-tissue penetration by
479 levofloxacin for target site bacterial killing in patients with sepsis. *Antimicrob Agents*
480 *Chemother* 2003; **47**: 3548-53.
481
482 Bellmann R, Kuchling G, Dehghanyar P *et al.* Tissue pharmacokinetics of levofloxacin in
483 human soft tissue infections. *Br J Clin Pharmacol* 2004; **57**: 563-68.

484 Hutschala D, Skhirtladze K, Zuckermann A *et al.* *In vivo* measurement of levofloxacin
485 penetration into lung tissue after cardiac surgery. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**:
486 5107-11.

487

488 Tasso L, Bettoni CC, Oliveira L *et al.* Evaluation of gatifloxacin penetration into skeletal
489 muscle and lung by microdialysis in rats. *Int J Pharmaceutics* 2008 (*in press*).

490

491 Clinical Laboratory Standartization Institute. 2003. Methods for dilution antimicrobial
492 susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard – sixth edition.
493 NCCLS document M7-A6, Wayne, Pennsylvania,USA.

494

495 Zhang X, Overholser BR, Kays MB *et al.* Gatifloxacin pharmacokinetics in healthy men and
496 women. *J Clin Pharmacol* 2006; **46**: 1154-62.

497

498 Zhanel GG, Walkty A, Vercaigne L *et al.* The new fluoroquinolones: a critical review.
499 *Canadian J Infect Dis* 1999 **10**: 207-38.

500

501 Delacher S, Derendorf H, Hollenstein U *et al.* A combined *in vivo* pharmacokinetic-*in vitro*
502 pharmacodynamic approach to simulate target site pharmacodynamics of antimicrobials in
503 humans. *J Antimicrob Chemother* 2000; **46**: 733-9.

504

505 Schuck EL, Dalhoff A, Stass H *et al.* Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) evaluation
506 of a once-daily treatment using ciprofloxacin in an extended-release dosage form. *Infection*
507 2005, **33** Suppl 2: 22-8.

508

509 Palma EC, Dalla Costa T. Modelagem PK/PD do efeito bactericida do norfloxacin contra
510 diferentes microrganismos. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da
511 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Dissertação de Mestrado, 2003, 110 p.

512

513 Noreddin AM, Marras TK, Sanders K *et al.* Pharmacodynamic target attainment against
514 *Streptococcus pneumoniae* using levofloxacin 500 mg, 750 mg and 1000 mg once daily in
515 plasma (P) and epithelial lining fluid (ELF) of hospitalized patients with community-acquired
516 pneumonia (CAP). *Int J Antimicrob Agents* 2004; **24**: 479-84.

517

518

519

520

Figures Legend

521

522

523 **Figure 1.** Levofloxacin fitted killing-curves following 167 mg q8h (A) 250 mg q12h (B), 250
524 mg q24h (C), 500 mg q24h (D), 375 mg q12h (E), 750 mg q24h (F), 500 mg q12h (G), and
525 1000 mg q24h (H). Control without drug (■) and treated group (●); n = 3 experiments/group;
526 errors bars indicate standard deviation.

527

528 **Figure 2.** Gatifloxacin fitted killing-curves following 50 mg q24h (A), 50 mg q12h (B), 100 mg
529 q24h (C), 200 mg q24h (D). Control without drug (■) and treated group (●); n = 3
530 experiments/group; errors bars indicate standard deviation.

531

532 **Figure 3.** Levofloxacin (left panel) and gatifloxacin (right panel) killing-curves for constant
533 concentrations multiples of the respective MIC: levofloxacin 1 mg/L and gatifloxacin 0.5
534 mg/L. Control without drug (■) and treated group: 0.5 x MIC (●), 1.0 x MIC (▲) and 2.0 x MIC
535 (◆); n = 3 experiments/group; errors bars indicate standard deviation.

536
537**Table 1.** PK/PD indices associated with the simulated dosage regimens for levofloxacin and gatifloxacin and PK/PD parameters determined by modeling the killing effect of levofloxacin and gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* to an E_{\max} model with fluctuating concentrations.

Simulated dose regimens	Daily dose (mg)	fC_{\max} (mg/L)	fC_{\max}/MIC	$f\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ (mg.h/L)	$f\text{AUC}_{0-24\text{h}}/\text{MIC}$ (h)	EC_{50} (mg/L)	k_{\max} (h^{-1})	MSC (R^2)
Levofloxacin (MIC = 1.0 mg/L)								
250 mg q24h	250	3.2	3.2	15	15	7.14	0.70	3.0 (0.97)
167 mg q8h		2.2	2.2	30	30	4.98	0.70	3.7 (0.97)
250 mg q12h	500	3.2	3.2	30	30	2.83	0.30	2.8 (0.90)
500 mg q24h		6.4	6.4	30	30	5.71	0.37	2.3 (0.90)
375 mg q12h	750	4.9	4.9	45	45	3.00	0.32	3.7 (0.97)
750 mg q24 h		9.8	9.8	45	45	2.20	0.30	5.0 (0.99)
500 mg q12 h	1000	6.4	6.4	60	60	0.87	0.17	4.6 (0.99)
1000 mg q24 h		12.8	12.8	60	60	1.79	0.35	5.1 (0.99)
Average \pm SD						3.57 \pm 2.16*	0.40 \pm 0.19	
Gatifloxacin (MIC = 0.5 mg/L)								
50 mg q24h	50	0.35	0.7	3.4	6.8	0.57	0.42	2.9 (0.92)
50 mg q12h	100	0.35	0.7	6.8	13.6	0.38	0.3	3.6 (0.96)
100 mg q24h		0.7	1.4	6.8	13.6	1.35	0.57	4.4 (0.98)
200 mg q24h	200	1.4	2.8	13.6	27.2	1.50	0.64	4.3 (0.99)
Average \pm SD						0.95 \pm 0.56*	0.48 \pm 0.15	

538

*Statistical difference ($\alpha = 0.05$); SD = standard deviation; fC_{\max} = free peak concentrations in plasma; $f\text{AUC}$ = area under the free plasma concentration time curve.

Table 2. PK/PD parameters determined by modeling the killing effect of constant concentrations multiples of MIC of levofloxacin and gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* to an E_{max} model

Drugs and dosing regimens	EC_{50} (mg/L)	k_{max} (h^{-1})	MSC (R^2)
Levofloxacin (MIC = 1.0 mg/L)			
0.5 x MIC	2.49	0.29	4.4 (0.99)
1 x MIC	3.27	0.33	4.4 (0.99)
2 x MIC	2.50	0.40	4.4 (0.99)
Average \pm SD	$2.75 \pm 0.45^*$	0.34 ± 0.06	
Gatifloxacin (MIC = 0.5 mg/L)			
0.5 x MIC	0.64	0.16	5.6 (0.98)
1 x MIC	0.83	0.38	5.6 (0.99)
2 x MIC	1.62	0.62	5.6 (0.99)
Average \pm SD	$1.03 \pm 0.52^*$	0.39 ± 0.23	

*Statistical difference ($\alpha = 0.05$); SD = standard deviation.

Figure 1.

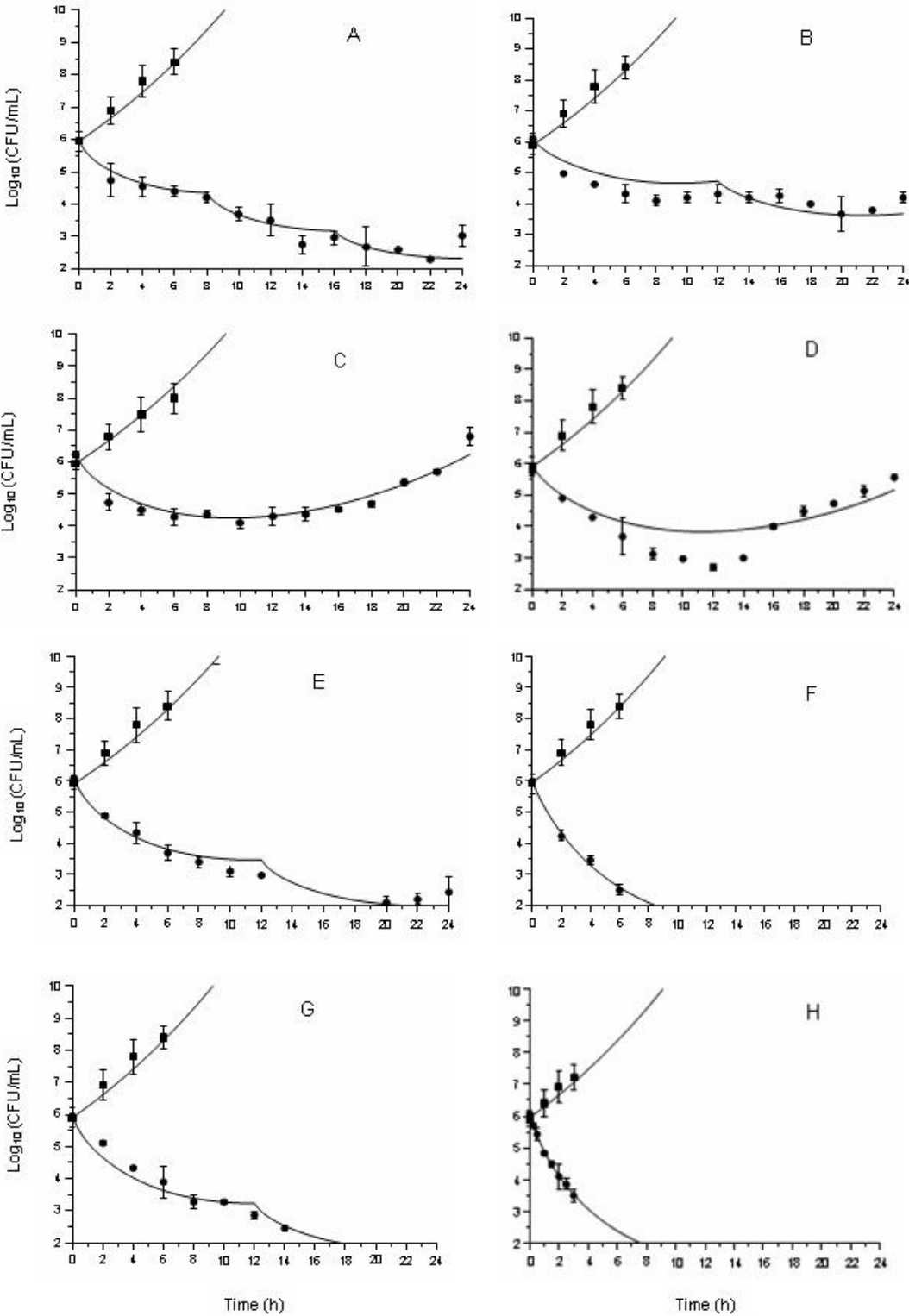


Figure 2.

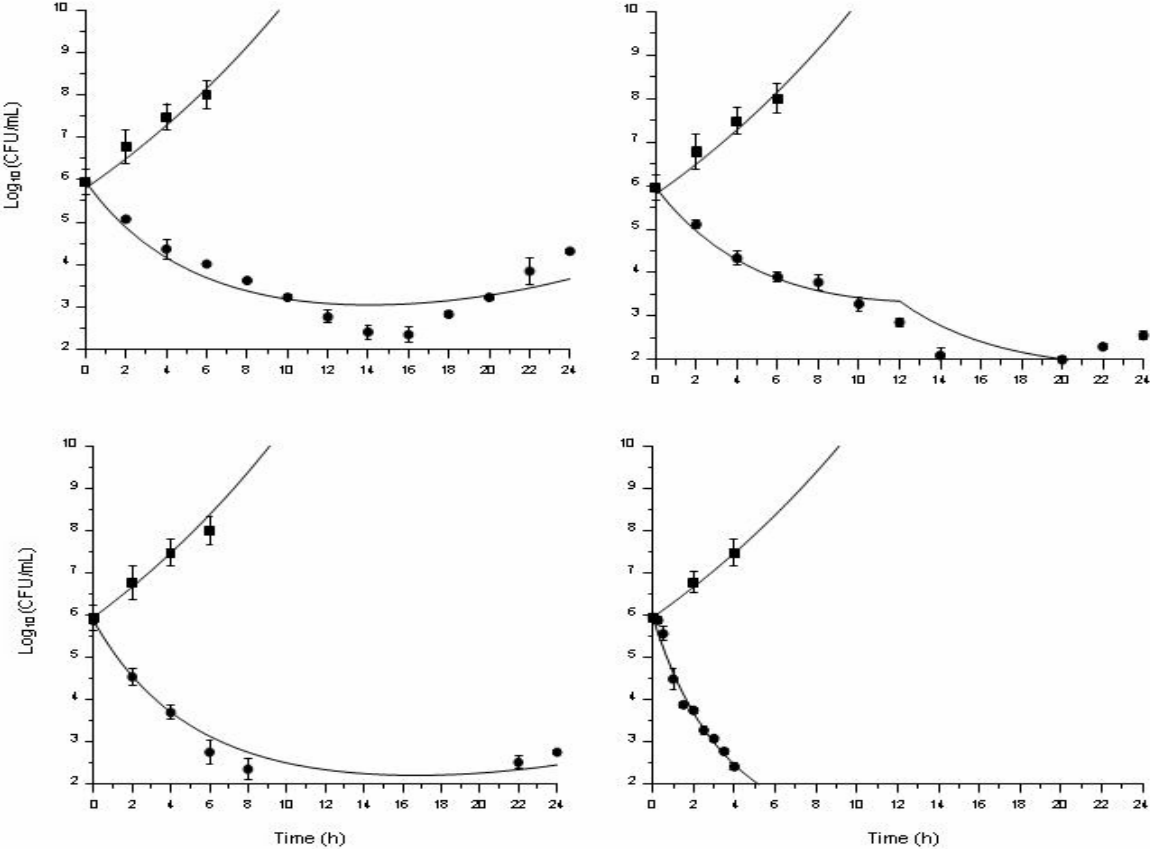
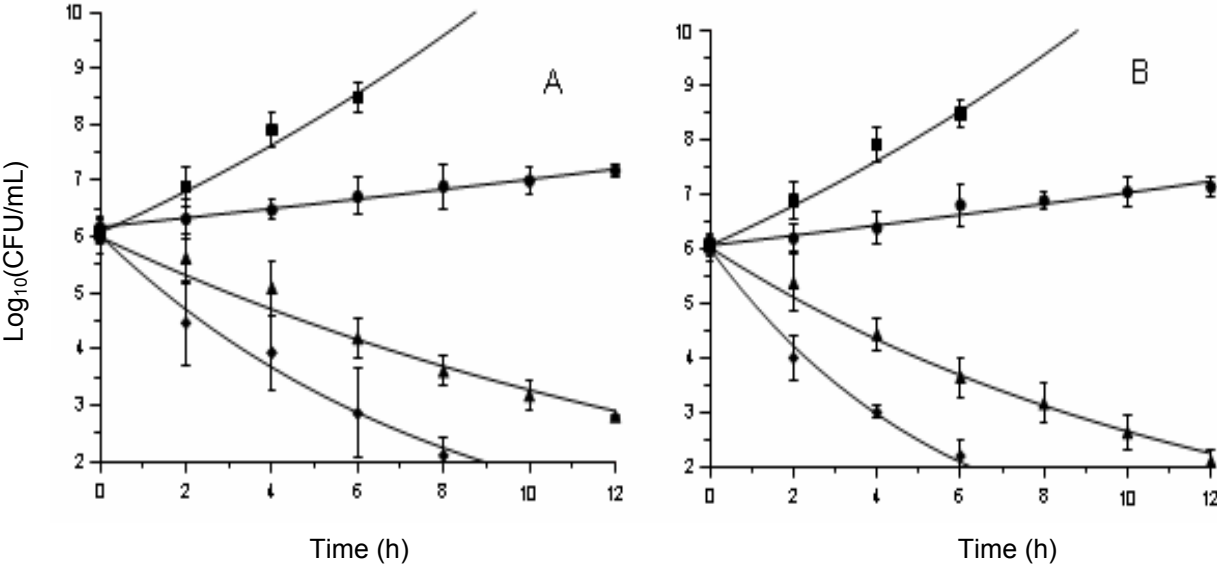


Figure 3.



CAPÍTULO 7: CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento de doenças infecciosas ainda está baseado, principalmente, em tentativas e erros, nem sempre considerando abordagens mais científicas. A seleção de esquemas posológicos de antimicrobianos leva em consideração a CIM, parâmetro estático determinado *in vitro* frente a concentrações constantes do fármaco. Essas concentrações não representam o real perfil de exposição da bactéria ao fármaco, pois comumente *in vivo* as concentrações dos antimicrobianos são flutuantes devido à administração de doses fixas a intervalos fixos.

A presente pesquisa foi desenhada com o intuito de avaliar e comparar o comportamento farmacológico do levofloxacino e do gatifloxacino frente a uma bactéria recorrente em pneumonia adquirida na comunidade (PAC). Para se chegar a esse objetivo foi necessário conhecer, primeiramente, a farmacocinética e a penetração pulmonar do gatifloxacino. As concentrações livres pulmonares e musculares foram determinadas por microdiálise em roedores, buscando-se estabelecer uma relação entre as concentrações plasmáticas totais e as livres teciduais para esse fármaco. Os dados de concentração livre pulmonar do levofloxacino em humanos já estavam disponíveis na literatura. Posteriormente, as concentrações livres pulmonares esperadas para humanos para ambas as fluorquinolonas foram simuladas em modelo de infecção experimental *in vitro* frente ao *Streptococcus pneumoniae*. Para estabelecer a relação entre as concentrações livres simuladas *in vitro* (PK) e o efeito de morte bacteriana observado (PD), empregou-se a modelagem PK/PD, que também foi utilizada para comparar as duas fluorquinolonas.

Visando determinar a farmacocinética do gatifloxacino em roedores foi desenvolvida e validada metodologia analítica por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à extração em fase sólida (*on line*). Os parâmetros de performance analítica como linearidade, limite de quantificação, exatidão e precisão intra e interdia foram avaliados e a metodologia foi validada segundo o preconizado pela FDA para matrizes biológicas. A estabilidade do fármaco em plasma também foi

avaliada e demonstrou não haver degradação significativa dentro das condições avaliadas.

Na etapa seguinte do trabalho, realizou-se a determinação da biodisponibilidade e dos parâmetros farmacocinéticos do gatifloxacino após a administração das doses de 6 mg/kg pelas vias intravenosa e oral e 12 mg/kg pela via oral, empregando ratos Wistar, devido aos dados restritos existentes na literatura sobre a farmacocinética do gatifloxacino em roedores. Conhecer a faixa de linearidade de doses e os parâmetros farmacocinéticos do fármaco era importante para a etapa seguinte de avaliação de penetração tecidual do gatifloxacino. O modelo aberto de dois compartimentos descreveu adequadamente o perfil plasmático após administração intravenosa do fármaco. Após administração oral de 12 mg/kg o modelo aberto de um compartimento com absorção de primeira ordem apropriadamente modelou os dados experimentais. O fármaco apresentou farmacocinética linear na faixa de 6-12 mg/kg, com biodisponibilidade oral em torno de 30%.

Considerando que a maioria das infecções ocorre em nível tecidual e não no sangue, o conhecimento das concentrações disponíveis do antimicrobiano na biofase é importante para o desenho de melhores regimes posológicos. Conhecendo-se a farmacocinética plasmática do gatifloxacino em roedores, determinaram-se as concentrações livres teciduais (musculares e pulmonares) empregando a técnica de microdiálise, a qual possibilita conhecer as concentrações farmacologicamente ativas em qualquer biofase do organismo. Diferentes metodologias foram empregadas para avaliar a recuperação das sondas de microdiálise *in vitro* e *in vivo*, como diálise, retrodiálise e fluxo líquido zero, sendo avaliada a influência do fluxo na recuperação das sondas, bem como a dependência da recuperação em relação à concentração do fármaco. Os resultados evidenciaram que a recuperação é concentração independente e que não há diferença estatisticamente significativa entre as diferentes metodologias empregadas para a determinação da recuperação das sondas, que foi de aproximadamente 30%, tanto para os métodos *in vitro* quanto por retrodiálise *in vivo*, para um fluxo de 1,0 $\mu\text{L}/\text{min}$. Os perfis de concentração livre pulmonar e muscular do gatifloxacino em ratos Wistar se sobrepuseram, evidenciando que o fármaco penetra de modo semelhante

nos dois tecidos. As concentrações livres teciduais foram semelhantes às concentrações livres plasmáticas do fármaco, levando à determinação de um fator de penetração em torno de 1 para ambas as biofases. Finalmente, através de modelagem matemática, foi possível prever as concentrações livres teciduais do gatifloxacino baseando-se nas concentrações plasmáticas totais observadas, levando-se em consideração a ligação às proteínas plasmáticas.

Sabendo-se que a penetração tecidual do gatifloxacino em roedores é extensiva, que o fármaco não apresenta dificuldades em permear as membranas pulmonares e que os níveis teciduais e plasmáticos livres são semelhantes, assumiu-se que a mesma relação deveria ocorrer em humanos. Desse modo, visando avaliar o efeito de morte bacteriana pulmonar causado por diferentes posologias do gatifloxacino, utilizaram-se os dados farmacocinéticos plasmáticos do gatifloxacino obtidos na literatura para prever as concentrações livres pulmonares esperadas em humanos. Essas concentrações foram então simuladas em modelo de infecção experimental *in vitro* contra *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619. As concentrações livres do levofloxacino simuladas *in vitro* foram obtidas da literatura em estudo conduzido em humanos utilizando microdiálise pulmonar após cirurgia cardíaca.

No modelo de infecção experimental *in vitro* simularam-se as concentrações pulmonares esperadas após o emprego de diferentes regimes posológicos com administração em doses múltiplas de ambas as fluorquinolonas (concentrações flutuantes do fármaco no sistema), bem como concentrações constantes múltiplas da CIM. As curvas de morte bacteriana por tempo obtidas foram modeladas utilizando-se modelo PK/PD de E_{max} com auxílio de programa de regressão não-linear (Scientist®).

O modelo de E_{max} empregado descreveu adequadamente o efeito farmacodinâmico temporal das duas fluorquinolonas no sistema *in vitro*, tanto para concentrações flutuantes como para concentrações constantes dos fármacos. Para o regime de doses múltiplas, o gatifloxacino demonstrou possuir maior potência *in vitro* ($EC_{50} = 0,95 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$) frente ao *Streptococcus pneumoniae* do que o levofloxacino ($EC_{50} = 3,57 \pm 2,16 \mu\text{g/mL}$), embora as velocidades máximas de morte

bacteriana (k_{\max}) para ambas as fluorquinolonas tenham se mostrado semelhantes ($k_{\max, \text{levofloxacino}} = 0,40 \pm 0,19 \text{ h}^{-1}$ e $k_{\max, \text{gatifloxacino}} = 0,48 \pm 0,15 \text{ h}^{-1}$). Para concentrações constantes, o EC_{50} foi maior ($\alpha = 0,05$) para o levofloxacino que para o gatifloxacino, com K_{\max} estimados pelo modelo semelhantes para ambos os fármacos: levofloxacino, $EC_{50} = 2,75 \pm 0,45 \text{ } \mu\text{g/mL}$ e $k_{\max} = 0,34 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$; gatifloxacino, $EC_{50} = 1,03 \pm 0,52 \text{ } \mu\text{g/mL}$ e $k_{\max} = 0,39 \pm 0,23 \text{ h}^{-1}$. Os resultados de k_{\max} demonstraram que ambos os fármacos são igualmente eficazes no modelo empregado.

Nenhum dos índices PK/PD foi capaz de prever o desfecho da infecção (redução do número de UFC/mL) para todas as situações investigadas, o que corrobora o fato de que os índices que utilizam a CIM não refletem adequadamente as interações que ocorrem na biofase onde o efeito é decorrente das concentrações flutuantes do fármaco frente à bactéria. Observou-se, também, que regimes posológicos que apresentam o mesmo índice PK/PD como fC_{\max}/CIM ou $f\text{ASC}_{0-24}/\text{CIM}$ levam a diferentes reduções no número de UFC/mL no período de tempo investigado, confirmando as limitações dessa abordagem.

Em seu conjunto, os resultados desse trabalho de modelagem PK/PD de quinolonas vêm agregar a outros já descritos na literatura. O modelo PK/PD foi capaz de descrever adequadamente o efeito do levofloxacino e do gatifloxacino contra *Streptococcus pneumoniae in vitro* para todas as simulações investigadas permitindo a comparação dos fármacos. Dessa forma, o modelo PK/PD pode ser usado para simular regimes alternativos para essas fluorquinolonas visando otimizar a terapia para tratar a pneumonia adquirida na comunidade.

ANEXO 1

Besides the extraction efficiency (EE) and retrodialysis (RD) methods employed to assess gatifloxacin relative recovery from the microdialysis probes, a third method was used, no-net-flux (NNF). The same system (probes and microinfusion pump) and flow rate (2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$) described earlier in the microdialysis article (Chapter 5) were employed to perform the *in vitro* and *in vivo* experiments with NNF. Here are presented the specificity of the method employed and the results of these experiments.

1. No-net-flux (NNF) *in vitro*

For the NNF experiment the microdialysis probes were placed into a lactate Ringer's solution containing 160 ng/ml of gatifloxacin. The microdialysis probes were perfused with lactated Ringer's solution containing 0, 100, 200 and 400 ng/ml of gatifloxacin. An equilibration time of 1 hour at 2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ was allowed before samples collection. For every change in the perfusate concentration the probes ($n = 3$) were allowed to re-equilibrate with the new concentration for 1 hour. A total of three dialysate samples were collected for each concentration at 30 min intervals. The drug concentration in perfusate and in the gatifloxacin solution in each tube was determined by HPLC. The recovery was determined by plotting the net change in gatifloxacin perfusate and dialysate concentrations versus the perfusate concentration. The slope of the curve represents the relative recovery and the intercept of the curve with the x-axis represents the point of no-net-flux, which is equal to the free gatifloxacin concentration in the solution tested.

2. No-net-flux (NNF) *in vivo*

To evaluate the probes recovery employing the NNF method *in vivo*, the drug concentration in the target site needs to be at steady-state. This was achieved by a constant infusion of the drug after the animals were anesthetized. The animals ($n = 3$) received a loading dose (0.79 mg/kg) followed by a maintenance dose (0.25 mg/kg \cdot h) gatifloxacin at a flow rate of 5.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ by the lateral tail vein using a catheter coupled to microdialysis microinjection pump. Blood samples were collected for 8 hours by the carotid artery previously cannulated at 0.75, 1.5, 3.5, 5.5 and 7.5 h after loading dose. The plasma was separated by ultracentrifugation and analyzed by HPLC.

After established that steady-state concentrations were obtained with this protocol, the NNF calibration experiment was performed in other group of animals. The anesthesia and cannula inserting in rats skeletal muscle ($n = 3$) were carried out as described in our article (Tasso *et al.*, 2008). After the steady-state was reached (1.5 h), four different gatifloxacin concentrations (0, 100, 200 and 400 ng/ml) were perfused through the probe at a flow rate of 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Microdialysates were collected with 30 min intervals. After each change

in perfusate concentration the probes were allowed to equilibrate for 1 hour. The probe recovery is the slope of the regression line obtained from the linear regression analysis.

3. Results

For the NNF experiments, the net changes in the dialysate and perfusate concentrations were plotted against the perfusate concentration. The steady state condition was obtained *in vivo* before the beginning of the NNF experiment. The average curves obtained *in vivo* ($y = -0.289x + 91.36$, $r = 0.981$) and *in vitro* ($y = -0.309x + 65.3$, $r = 0.997$) are shown in Fig. 1. The slope of the regression lines represents the drug recovery. The recovery obtained by this method ranged from 28.2 to 34.3 % and 28.2 to 29.7 % for *in vitro* and *in vivo* settings, respectively. The average recovery obtained by this method was 28.9 ± 0.8 % and 30.9 ± 2.9 % for *in vivo* and *in vitro*, respectively.

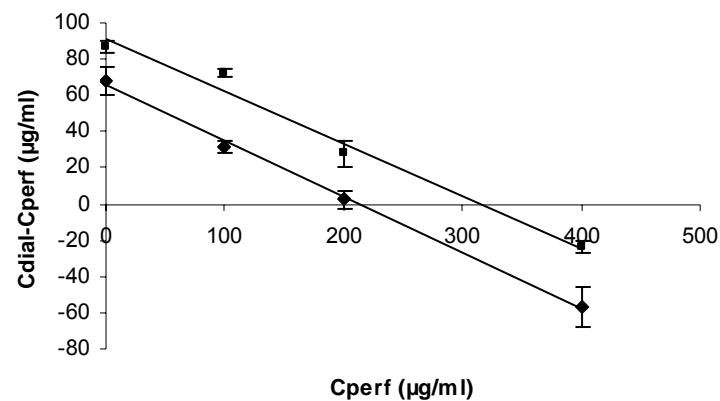


Fig. 1. Average no-net-flux plot for gatifloxacin *in vitro* (◆) and *in vivo* (■) at a flow rate of 2.0 µl/min.

The NNF is considered a more precise method than EE or RD to determine the recovery because the drug diffuses from both sides of the membrane. Independently on the method employed (EE, RD or NNF), however, gatifloxacin recovery was around 30% *in vitro* as well as *in vivo*.

BIOGRAFIA

Leandro Tasso, nascido em 21/11/1977, filho de Nilce Tereza Tasso, ingressou na Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) em 1997. Participou como bolsista voluntário nos trabalhos intitulados “Métodos simplificados de análise qualitativa e quantitativa de antidepressivos tricíclicos” (1998/1999), “Avaliação do teor de cálcio em medicamentos de venda livre indicados para o tratamento e prevenção da osteoporose” (1999) e “Monitoramento terapêutico de antidepressivos tricíclicos em Hospital-Escola de Porto Alegre, RS” (1999/2000). Foi bolsista de iniciação científica FAPERGS com o projeto “síntese do *trans*-resveratrol: uma fitoalexina natural com propriedades quimiopreventivas do câncer e de cardiopatias” (1999-2000). Graduou-se em Farmácia, com habilitação Farmacêutico Industrial, em julho de 2001. Em setembro de 2001 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), nível Mestrado, sob a orientação da Profa. Dra. Teresa Dalla Costa, no projeto “Avaliação pré-clínica em ratos do perfil farmacocinético de um novo derivado *N*-fenilpiperazínico (LASSBio-581)”, como bolsista CAPES, recebendo o grau acadêmico de Mestre em setembro de 2003. Em 2004 foi aprovado em concurso para professor adjunto da disciplina de farmacocinética do Curso de Farmácia da Universidade de Caxias do Sul (UCS), departamento de Ciências Básicas da Saúde (DCBM), onde atua até o presente momento em diversos cursos de graduação (Farmácia, Nutrição e Educação Física) com diferentes disciplinas sob a sua responsabilidade: Farmacocinética, Biofísica, Fisiologia, Tecnologia Farmacêutica, Farmacotécnica Homeopática e Controle de Qualidade. Também é professor em cursos de especialização da UCS na área farmacológica para os cursos de Psicologia e Educação Física. Orienta trabalhos de estágios sequenciais no curso de Farmácia, bem como trabalhos de conclusão de curso. Coordena laboratórios de ensino e o Núcleo Fisi-Farmacológico da UCS. Em março de 2005 ingressou no curso de Doutorado do PPGCF da UFRGS com o projeto “Modelagem PK/PD das fluorquinolonas levofloxacino e gatifloxacino” sob a orientação da Profa. Dra. Teresa Dalla Costa. Foi professor substituto da UFRGS nas disciplinas de Tecnologia Farmacêutica e Controle de Qualidade (graduação e ênfase) por dois anos (2005-2006).