

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Marco Antonio Ferraz Nogueira Filho

**FARMACOCINÉTICA POPULACIONAL PRÉ-CLÍNICA
E AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA DE FORMULAÇÃO
MICROEMULSIONADA DE ANFOTERICINA B**

Orientador (a): Prof^a Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara

2016

Marco Antonio Ferraz Nogueira Filho

**FARMACOCINÉTICA POPULACIONAL PRÉ-CLÍNICA
E AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA DE FORMULAÇÃO
MICROEMULSIONADA DE ANFOTERICINA B**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Prof^a Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

N778f Nogueira Filho, Marco Antonio Ferraz
Farmacocinética populacional pré-clínica e avaliação de segurança de formulação
microemulsionada de Anfotericina B / Marco Antonio Ferraz Nogueira Filho. – Araraquara, 2016.
138 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas, área Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Rosângela Gonçalves Peccinini.

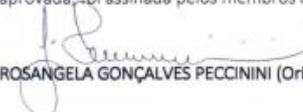
1. Farmacocinética populacional. 2. Anfotericina B. 3. Validação de método. 4. UPLC.
5. Avaliação de segurança. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Título.

CAPES: 40500005



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE MARCO ANTONIO FERRAZ NOGUEIRA FILHO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CÂMPUS DE ARARAQUARA-UNESP.

Aos 16 dias do mês de Setembro do ano de 2016, às 09:00, no(a) Anfiteatro da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes Professores Doutores: ROSANGELA GONÇALVES PECCININI (Orientador) do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da UNESP, ARNÓBIO ANTONIO DA SILVA JUNIOR do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, KELLY CHRYSTINA PESTANA BIAVA do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista - UNIP do Câmpus de Araraquara, CLARICE MADALENA BUENO ROLIM do Departamento de Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria e ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO DE MARCO ANTONIO FERRAZ NOGUEIRA FILHO, intitulado "FARMACOCINÉTICA PRÉ- CLÍNICA E AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA E EFICÁCIA DE INOVADORA FORMULAÇÃO DE ANFOTERICINA B". O Professor Doutor ARNÓBIO ANTONIO DA SILVA JUNIOR e a Professora Doutora CLARICE MADALENA BUENO ROLIM participaram da defesa por meio de vídeo-conferência. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora presentes e virtualmente pelo Professor Doutor ARNÓBIO ANTONIO DA SILVA JUNIOR e pela Professora Doutora CLARICE MADALENA BUENO ROLIM, tendo recebido o conceito final: Aprovado. Registre-se, que nesta ata, não constará as assinaturas dos membros da Comissão Examinadora participantes por meio de vídeo-conferência. Serão anexados a esta ata, pareceres circunstanciados dos membros participantes por vídeo-conferência, enviados por e-mail. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora presentes.


ROSANGELA GONÇALVES PECCININI (Orientador)

ARNÓBIO ANTONIO DA SILVA JUNIOR (parecer anexo)
Membro participante por vídeo-conferência


KELLY CHRYSTINA PESTANA BIAVA

CLARICE MADALENA BUENO ROLIM (parecer anexo)
Membro participante por vídeo-conferência


ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

RESUMO

Depois de quase 50 anos de uso na terapia, a alta potência e amplo espectro de ação asseguram que a anfotericina B (AmB) continue a ser o fármaco de escolha na terapia moderna contra infecções fúngicas invasivas. A AmB está associada a alta incidência de nefrotoxicidade e reações relacionadas à infusão, o que limita a sua utilização e muitas vezes requerem a redução da dose. Novas formulações estão sendo pesquisadas para melhorar as características farmacocinéticas da AmB, levando a novas alternativas de administração, hoje limitada à via intravenosa. No presente estudo, foi avaliado o perfil farmacocinético de um novo sistema microemulsionado de anfotericina B (MEAmB) desenhada por Franzini (2011) por via intravenosa e oral em ratos wistar (n=10), dose de 1mg / kg e 10mg / kg pelas vias intravenosa e oral respectivamente, além da avaliação preliminar de segurança. A formulação apresentou um perfil farmacocinético semelhante à AmB desoxicolato em sua administração intravenosa, sem diferenças significativas tanto nos parâmetros farmacocinéticos quanto na comparação “ponto a ponto”. A MEAmB trouxe ainda diminuição no potencial de nefrotoxicidade, mantendo os níveis de ureia e creatinina inalterados comparando-se pré e pós-exposição enquanto a AmB desoxicolato promoveu aumento significativo dos biomarcadores renais. A MEAmB apresentou uma baixa biodisponibilidade oral (apenas 5,8%) não permitindo os estudos de eficácia planejados para essa formulação. Ainda, através da aplicação da farmacometria, um modelo de farmacocinética populacional foi desenhado e validado para o melhor entendimento entre as covariáveis fisiológicas e ocasionais e a busca de possíveis fatores que impactam a farmacocinética da AmB.

Palavras chave: Farmacocinética populacional. Anfotericina B. validação de método. UPLC. Avaliação de segurança.

ABSTRACT

After nearly 50 years of use in therapy, high power and broad spectrum of action ensure that amphotericin B (AmB) remains the drug of choice in modern therapy against invasive fungal infections. The AmB is associated with high incidence of nephrotoxicity and infusion-related reactions, which limit their use and often require dose reduction. New formulations are being researched to improve the pharmacokinetic characteristics of AmB, that may lead to new alternative administration routes, limited today only to intravenous administration. In the present study, the pharmacokinetic profile of a new microemulsion system of amphotericin B (MEAmB) formulated by Franzini (2011) for intravenous and oral administration was investigated in wistar rats (n = 10), dose of 1mg / kg and 10mg / kg for intravenous and oral routes respectively, and also a preliminary assessment of safety oral administration. The formulation showed a pharmacokinetic profile similar to AmB deoxycholate in its intravenous administration, no significant differences were found in the pharmacokinetic parameters between the AmB deoxycholate and MEAmB. The MEAmB granted a statistical decrease in the nephrotoxicity potential, keeping urea and creatinine levels unchanged comparing pre- and post-exposure while AmB deoxycholate caused a significant increase in renal biomarkers. The MEAmB showed low oral bioavailability (only 5.8%) not allowing the efficacy studies planned for this formulation. A study of population pharmacokinetic was performed and a population pharmacokinetic model was designed and validated for the better understanding of the physiological and occasional covariates of AmB.

Keywords: Population pharmacokinetics. Amphotericin B. Method validation. UPLC. Safety assessment.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O: Água/Oléo

ACN: Acetonitrila

AI: Aspergilose Invasiva

AmB: Anfotericina B

AmB-D: Anfotericina B Desoxicolato

AmB-L: Anfotericina B Lipossomal

AmB-ME: Microemulsão incorporada de AmB

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC: Área sob a curva

ASMC: Área Sob o Momento da Curva

CCD: Ciclo de Congelamento e Descongelamento

CD: Curta Duração

CI: Clearance

C_{máx}: Concentração máxima

CO: Colesterol

C_p: Concentração Plasmática

CQ: Controle de Qualidade

CQA: Controle de Qualidade Alto

CQB: Controle de Qualidade Baixo

CQD: Controle de Qualidade Diluído

CQM: Controle de Qualidade Médio

CV: Coeficiente de Variação

DC: Débito Cardíaco

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPR: Desvio Padrão Relativo

EM (s): Emulsão (s)

EPR: Erro Padrão Relativo

ER: Ergosterol

F: Biodisponibilidade

FMN: Fator de Matriz Normalizado por PI

FS: Fosfatidilcolina de Soja

IC: Intervalo de Confiança

IFIs: Infecções Fúngicas Invasivas

IV: Intravenoso

K_{el} : Constante de Eliminação

K_{α} : Constante alfa

K_{β} : Constante beta

LD: Limite de Detecção

LD: Longa Duração

LIQ: Limite Inferior de Quantificação

LSQ: Limite Superior de Quantificação

m: massa

ME (s): Microemulsão (s)

MRT: Tempo de Residência Média

O/A: Óleo/Água

OS: Oleato de Sódio

PC: Padrão de Calibração

PI: Padrão interno

PK: Perfil Farmacocinético

PP: Pós Processamento

PVDF: Polipropileno

SCB: Sistema de Classificação Biofarmacêutica

$t_{1/2 \alpha}$: meia vida alfa

$t_{1/2 \beta}$: Meia vida beta

$T_{\text{máx}}$: Tempo Máximo

TW 20: Tween 20

UPLC: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

UV: Ultra Violeta

Vd: Volume de Distribuição

α -CD: Alfa Ciclodextrina

B-CD: Beta Ciclodextrina

γ -CD: Gama Ciclodextrina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação de distribuição da solubilidade de fármacos em diversos países (TAKAGI, et al 2006).

Figura 2 - Estrutura química da anfotericina B

Figura 3 - Abordagens para a melhoria de características dos fármacos de acordo com sua classificação biofarmacêutica

Figura 4 - Representação gráfica e estrutura química geral dos principais subtipos de CD

Figura 5 - Representação esquemática dos tipos de microemulsões

Figura 6 - Modelo gráfico para estimativa de biodisponibilidade oral e permeabilidade celular. Adaptado de Ritchie, 2011.

Figura 7 - Efeito do volume de fase da ME na incorporação de AmB a 25 C. Franzini, 2011.

Figura 8 - Diferença dos modelos polinomiais e NLME's

Figura 9 - Estrutura geral dos NLME's (adaptado de Vozech, 1982)

Figura 10 - curva analítica da AmB (n=5 replicatas)

Figura 11 - Cromatograma branco do método bioanalítico da AmB

Figura 12 - Cromatograma "zero" do método bioanalítico da AmB

Figura 13 - Cromatograma do método bioanalítico da AmB (AmB 1ug/mL, nifedipino 20 ug/mL)

Figura 14 - Controles de qualidade utilizados na validação do método bioanalítico da AmB.

Figura 15 - curva do método bioanalítico da AmB.

Figura 16 - Estudo de efeito residual da AmB.

Figura 17 - Perfis Farmacocinéticos médios obtidos após a administração de Anforicin® e MEAmB (n=5, 1mg/kg).

Figura 18 - Perfil farmacocinético médio (abaixo) e individuais (detalhe) após administração oral de MEAmB (n=5, 10mg/kg).

Figura 19 - Comparação estatística dos valores de ureia plasmática pré e pós exposição em dose única (n=5)

[Figura 20 - Comparação estatística dos valores de creatinina plasmática pré e pós exposição em dose única \(n=5\)](#)

[Figura 21 - Concentrações plasmáticas categorizadas por formulação](#)

[Figura 22 - Qualidade de ajuste verificada por concentrações observadas vs predições individuais de M1](#)

[Figura 23 - Eta-Eta de M1](#)

[Figura 24 - Predições individuais \(linhas\), concentrações observadas \(pontos\) vs tempo para M1](#)

[Figura 25 - Predições individuais \(linhas\), concentrações observadas \(pontos\) vs tempo para M2](#)

[Figura 26 - Exemplos de ajustes individuais de concentração plasmática vs tempo de M2](#)

[Figura 27 - Estrutura de M3](#)

[Figura 28 - Predições individuais \(linhas\), concentrações observadas \(pontos\) vs tempo de M3](#)

[Figura 29 - Exemplos de ajuste de concentração plasmática vs tempo de M3](#)

[Figura 30 - CWRES vs IPRED e Q-Q de M3](#)

[Figura 31 - Histograma dos parâmetros farmacocinéticos obtidos na reamostragem não paramétrica \(n = 1000\)](#)

[Figura 32 - Dispersão de covariáveis vs parâmetros farmacocinéticos.](#)

[Figura 33 - Covariável formulação vs parametros farmacocinéticos](#)

[Figura 34 - Relação entre covariável formulação e parâmetros farmacocinéticos.](#)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fármacos aprovados que utilizaram a farmacometria em seus estudos reurolatórios

Tabela 2 - Médias das concentrações utilizadas para construção da curva de calibração analítica. Estão expressas precisão através do desvio padrão relativo (DPR) e exatidão da curva. (n=5)

Tabela 3 - Concentração nominal, médias das concentrações experimentais que construíram a curva de calibração bioanalítica. Precisão expressa em desvio padrão relativo (DPR) e exatidão da curva (n=4)

Tabela 4 - Estudo de estabilidade da AmB (n=5)

Tabela 5 - Estudo de efeito matriz (n=5)

Tabela 6 - Parâmetros farmacocinéticos das administrações intravenosas de anfotericina B comercial (Anforicin®) e da microemulsão de anfotericina B (AmB-ME).

Tabela 7 - Comparação estatística “ponto a ponto” das concentrações plasmáticas obtidas nas administrações intravenosas de Anforicin® e AmB-ME apresentado em médias (IC95).

Tabela 8 - Parâmetros farmacocinéticos obtidos através da reamostragem não paramétrica (Bootstrap, n = 1000).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

1 - Introdução

2 - Revisão Bibliográfica

Anfotericina B: características farmacológicas, toxicidade e apresentações farmacêuticas.

Impacto das características físico-químicas de fármacos na farmacocinética e na elaboração da formulação

Fundamentação teórica da Farmacocinética populacional e o impacto da farmacometria nas decisões regulatórias

3 - OBJETIVOS

Objetivos Gerais

4 – Materiais e Métodos

4.1 – Materiais

4.1.1. Matérias primas, reagentes e solventes

4.1.2. Equipamentos

4.1.3. Correlatos

4.1.4. Software

4.2 Equipamentos e sistema cromatográfico

4.3 Preparo da solução comercial AmB desoxicolato (Anforcin®)

4.4 Preparo da Solução de AmB- β -CD

4.5 Preparo da Formulação AmB-ME

4.5.1 Estudo de incorporação da formulação

4.6 Processamento da amostra biológica

4.7 Validação

4.7.1 Linearidade

[Curva analítica](#)

[Curva bioanalítica](#)

[4.7.2 Limite inferior de quantificação \(LIQ\)](#)

[4.7.3 Precisão](#)

[4.7.4 Exatidão](#)

[4.7.5 Limite de detecção \(LD\)](#)

[4.7.6 Recuperação](#)

[4.7.7 Estabilidade](#)

[4.7.8 Controle de qualidade diluído \(CQD\)](#)

[4.7.9 Seletividade](#)

[4.7.10 Efeito matriz](#)

[4.7.11 Efeito residual ou Carryover](#)

[4.7.12 Análise dos resultados da validação](#)

[4.8 Perfil Farmacocinético](#)

[4.8.1 Animais](#)

[4.8.2 Protocolo experimental](#)

[4.8.3 Análise farmacocinética](#)

[4.9 .Análises in silico](#)

[4.9.1 – Desenvolvimento do modelo farmacocinético base](#)

[4.9.2 Modelos de covariáveis](#)

[4.9.3 Avaliação do Modelo Final](#)

[4.10.1 Creatinina](#)

[4.10.2 Ureia](#)

[5. RESULTADOS E DISCUSSÃO](#)

[5.1 Curva analítica para a determinação da concentração de AmB na microemulsão](#)

[5.2 Validação do método bioanalítico](#)

[4.2.1 Curva bioanalítica e linearidade](#)

[4.2.2 Estabilidade](#)

[5.2.3 Efeito matriz](#)

[5.3 Análise farmacocinética](#)

[5.4 – Investigação dos parâmetros bioquímicos renais](#)

[5.4.1 Determinação de Ureia](#)

[5.4.2 – Determinação de Creatinina](#)

[5.5 – Análise de Farmacocinética Populacional *in silico*](#)

[5.5.2 Modelo de covariáveis](#)

[5.5.2.1 Peso corporal](#)

[5.5.2.2 Formulação como covariável](#)

[6. CONCLUSÕES](#)

[REFERENCIAS](#)

[ANEXOS](#)

1 - Introdução

As infecções fúngicas continuam sendo a maior causa de morbidade e mortalidade entre pacientes de alto risco. Os patógenos estão se tornando cada vez mais resistentes e as opções terapêuticas atuais incluem limitações relacionadas ao espectro inadequado de atividade, falta de eficácia, pequeno índice de tolerância, interações com outros fármacos, perfis farmacocinéticos inadequados, elevada toxicidade e custo excessivo (MERHAV *et al.*, 1997; MUNOZ *et al.*, 2008).

A maioria dos fungos, em geral, não causa danos significativos em indivíduos saudáveis, porém em pacientes com deficiências na imunidade seus efeitos podem ser devastadores. Ainda, o uso de agentes imunossupressores de nova geração deu origem a um novo grupo de pacientes que apresentam alto risco de desenvolver infecções fúngicas como, por exemplo, os acometidos por artrite reumatoide e colites (OSTERMANN; BRYAN, 2007).

Após quase 50 anos de uso na terapêutica, a elevada potência e o amplo espectro de ação asseguram que a anfotericina B (AmB) permaneça como o fármaco de escolha na terapia moderna contra as infecções fúngicas invasivas que afetam os pacientes imunocomprometidos (FILLIPIN *et al.*, 2006).

A AmB é administrada endovenosamente e seu uso clínico é limitado por diversos fatores, tais como toxicidade – particularmente sobre o tecido renal – e outros efeitos adversos, além da dificuldade na adesão ao tratamento devido à necessidade de hospitalização e aos altos custos deste tratamento (FUKUI *et al.*, 2003; HARTSEL *et al.*, 2001; MORENO, 2001).

Vários grupos de pesquisa tem procurado alternativas dentro da área de tecnologia farmacêutica visando a obtenção de formulações de AmB mais eficazes, biocompatíveis e menos tóxicas.

Um novo sistema para veiculação da AmB foi desenvolvido por Franzini (2010), cuja obtenção envolveu a complexação com β -ciclodextrina e, posteriormente, a incorporação deste complexo a um sistema de liberação microemulsionado.

As β -ciclodextrinas são moléculas que permitem a formação de complexos de inclusão, formadas por oligossacarídeos cíclicos que dão origem a uma região externa hidrofílica e cavidade interna lipofílica. As ciclodextrinas já são reconhecidas como excipientes farmacêuticos úteis. Esses complexos oferecem uma variedade de vantagens físico-químicas, incluindo a possibilidade de maior solubilidade em água, estabilidade da solução e a expectativa de maior biodisponibilidade (SPAMER *et al.*, 2002).

As microemulsões são descritas como emulsões transparentes, nas quais um óleo ou fármaco lipofílico é disperso num meio aquoso, ou vice-versa, contendo um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado, gerando um sistema termodinamicamente estável (OLIVEIRA, 2004).

Após ensaios de caracterização da formulação proposta, Franzini (2010) concluiu que o sistema elaborado para a AmB apresentou um grande potencial como sistema de liberação de fármacos, situação que em teoria, melhoraria as características indesejáveis da AmB.

Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, foi possível observar alterações no perfil farmacocinético e cardiotoxicidade da doxorrubicina quando veiculada por um sistema de microemulsionado (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2012).

A AmB possui pronunciada nefrotoxicidade, baixa solubilidade e permeabilidade e biodisponibilidade oral de aproximadamente 5% (NASSAR *et al.*, 2009). É possível que a veiculação da AmB por este novo sistema aumente significativamente a biodisponibilidade oral do fármaco e modifique suas características de toxicidade.

As fases do desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos envolvem a investigação de suas características de atividade, toxicidade e perfil farmacocinético em pelo menos dois modelos animais anteriormente à sua aplicação em ensaios clínicos (FDA, 1997).

O perfil farmacocinético desfavorável e alta toxicidade em animais correspondem à metade dos problemas relacionados à falha no desenvolvimento de fármacos, sendo ideal que ensaios de farmacocinética e toxicidade sejam realizados nos estágios iniciais de desenvolvimento do produto (WATERBEEMD, 2003).

O objetivo dos estudos pré-clínicos é também a identificação de produtos promissores para a condução testes clínicos. A integração bem sucedida de todas as etapas da fase de ensaios pré-clínicos pode sustentar projeções dos regimes posológicos para humanos, tornando a fase clínica mais segura. Conceitos obtidos a partir estudos de farmacocinética e de eficácia pré-clínicas podem, dessa forma, prover um panorama que nos permite identificar um candidato potencial para futuros estudos clínicos (AMORE *et al.*, 2010).

Outra abordagem para a avaliação farmacocinética, útil ao desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, é a populacional, pertencente à área de farmacometria. A farmacometria é descrita como a aplicação de técnicas matemáticas e estatísticas para solucionar problemas farmacológicos (ETTE;

WILLIAMS, 2007). A aplicação da farmacometria refina o desenho, análise e interpretação de resultados experimentais.

Através da farmacocinética populacional é possível evidenciar correlações entre fatores fisiológicos e parâmetros farmacocinéticos úteis a individualização da dose e à previsão do comportamento de um fármaco após uma administração através de simulações *in silico*, prevendo riscos que um novo tratamento venha a apresentar (MOULD, 2012).

Este trabalho teve como objetivo a avaliação do perfil farmacocinético da AmB veiculada por este inovador sistema microemulsionado, a avaliação preliminar de segurança renal do produto e a aplicação da farmacometria para a interpretação e comparação dos resultados obtidos entre a administração da nova formulação de AmB e a da AmB desoxicolato em animais

2 - Revisão Bibliográfica

Anfotericina B: características farmacológicas, toxicidade e apresentações farmacêuticas.

A anfotericina é um agente antifúngico heptaênico obtido de culturas de *Streptomyces nodosus*. Tem sua ação por inibir a biossíntese de ergosterol, o que leva à formação de poros ao longo das membranas lipídicas. Com essa alteração, ocorre um aporte de metabólitos e íons essenciais e desequilíbrio osmótico e homeostático. Essa situação resulta na inibição do crescimento e consequente morte celular (ESPOSITO *et al.*, 2003).

Além da associação com os esteróis da membrana fúngica, a AmB pode se auto-associar em solução aquosa, levando a formação de monômeros e agregados tanto solúveis quanto insolúveis. As formas de agregação da AmB são divididas em dois tipos: agregados não solúveis e oligômeros solúveis em água, sendo esse último, a forma mais tóxica da AmB (ESPADA *et al.*, 2008). Araújo (2005) e Miñones (2005) afirmam que a seletividade da anfotericina perante as membranas celulares fúngicas são diretamente dependentes deste estado de agregação do fármaco.

A absorção da AmB por via oral é extremamente baixa (<5%), e, por esta razão, seu uso clínico é restrito à administração intravenosa.

A AmB é comercializada na forma de pó liofilizado associado ao desoxicolato (Fungizon®), que deve ser reconstituído em 10mL de soro glicosado a 5%. Nesta formulação convencional, a associação com o desoxicolato de sódio aumenta a

solubilidade do antifúngico (MARTINEZ, 2006), e podem ser observadas três diferentes formas de AmB nesta associação: monomérica, oligomérica e ainda, agregados de AmB com desoxicolato (FILLIPIN *et al.*, 2006). Conforme anteriormente descrito, este fato apresenta impacto sobre a seletividade do fármaco nas membranas fúngicas e, portanto, sobre o efeito farmacológico ou tóxico esperado.

A incorporação da AmB em sistemas lipídicos tem sido utilizada com o objetivo de reduzir seus efeitos tóxicos. Três sistemas lipídicos foram disponibilizados no mercado:

1. ABLC: complexo lipídico constituído de diesteroilfosfatidilcolina (DMPC) e diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG) (Abelcet®);
2. ABCD: dispersão coloidal de AmB em sulfato de coleslerila sódica (Amphocil®);
3. AmBisome: preparação lipossômica constituída de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol, diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG) e AmB (AmBisome®)

Assim como a AmB desoxicolato, essas formulações são de uso intravenoso, permanecendo o inconveniente da restrição a uso hospitalar.

Em 1955, os estudos iniciais *in vivo* com uma solução oral de AmB apresentaram resultados promissores. A AmB foi solubilizada em N,N dimetilacetamida e ácido hidrolórico e posteriormente misturada à água para que a formação de uma suspensão coloidal. Doses orais de 1 mg/kg a cada 12h por dois dias resultaram em 90-100% de sobrevivência de camundongos infectados por *C. albicans*. No mesmo estudo, uma segunda formulação utilizada por via oral foi preparada com 0,5% de lecitina contendo formas amorfas e cristalinas de

anfotericina B que renderam uma eficácia dose-dependente similar à suspensão coloidal em dosagens de 4, 8, 12, 16 e 32 µg/camundongos por dia, divididas em duas tomadas ao dia, por dois dias (JAMBOR, 1955).

Jambor e colaboradores (1955) administraram, durante 23 dias uma suspensão de AmB amorfa em salina associada à penicilina e estreptomicina em camundongos infectados com *Coccidioides immitis*. Os animais foram tratados com 12 mg ao dia por 23 dias via gavagem. Os resultados indicaram 100% de sobrevivência dos animais, entretanto, culturas *post-mortem* exibiram resultados positivos em pulmões, fígado, rins e 90% de culturas positivas para baço. Em apenas um animal não foram encontradas evidências de enfermidade, tanto por autópsia quanto por cultura.

Apesar dos resultados iniciais promissores, o desenvolvimento de uma terapia oral não aconteceria. Em contraste à eficácia observada em ratos e camundongos, estudos clínicos iniciais em humanos indicaram que doses excessivamente altas eram requeridas para produzir algum efeito notável e, ademais, efeitos adversos gastrointestinais significantes foram observados (THORNTON, 2009).

Em 1957, a DL50 de AmB i.v. foi estabelecida para camundongos, coelhos, cães e macacos utilizando AmB e desoxicolato sódico liofilizados e reconstituídos em água (BARTNER, 1957). Concomitantemente a esses estudos em animais, os primeiros estudos em humanos em pacientes com infecções sistêmicas foram realizados. Quatro formulações orais de AmB foram preparadas e administradas com dose diária máxima de 5g fracionadas de 4 a 8 tomadas. O fármaco foi administrado durante 5 a 350 dias e para todas as formulações concluiu-se que houve baixa absorção da AmB em decorrência das baixas concentrações plasmáticas observadas (THORNTON, 2009).

Estudos adicionais em humanos corroboraram com o achado de que preparações orais eram muito pouco absorvidas e falharam em produzir as concentrações plasmáticas necessárias, e dessa forma, concluiu-se que as formulações orais não apresentavam valor terapêutico (LITTMAN, 1958; LOURIA, 1958; KRAVETZ, 1961).

Em uma revisão intitulada “The Discovery and development of Amphotericin B”, James Dutcher (1968) escreve o seguinte resumo: *“A animação corria elevada quando os estudos experimentais mostraram que a administração oral de anfotericina B experimentalmente protegia camundongos e ratos das infecções fúngicas. Infelizmente, o bicho-papão da variabilidade inter-espécie em breve empinou sua feia cabeça. Experimentos em cães e humanos mostraram que não havia essencialmente nenhuma absorção gastrointestinal de AmB nessas espécies. Quase todos os artifícios químicos e físicos imagináveis foram explorados para superar a falta de absorção, sem sucesso.”*

De fato, a absorção oral de AmB é mínima (5%) e, por ser pouco absorvida pelo trato gastrointestinal, ela deve ser administrada exclusivamente por via intravenosa. Em solução glicosada, sob a forma de desoxicolato, é administrada de forma lenta, durante 4 a 6 horas, uma vez ao dia (SAAG; DISMUKES, 1988).

A administração intravenosa de anfotericina B determina o aparecimento de reações agudas relacionadas à infusão muito bem conhecidas como dispneia, febre, náuseas, vômitos, dores no peito, hipóxia, dores nas pernas, abdominais, nas laterais do corpo, rubor e urticária. Dessa forma, é necessário que a anfotericina B seja administrada em ambiente hospitalar sob supervisão clínica já que a administração das formulações utilizadas atualmente na terapêutica apresenta este variado espectro de efeitos adversos (RODEN, 2003).

A dose utilizada é de 0,7 – 1mg/kg/dia, e alcança concentrações plasmáticas máximas (Cmax.) e mínimas (Cmin.) de 1 a 3 e 0,2 a 0,5 µg/mL respectivamente. A concentração inibitória mínima relatada para *C. albicans* é de 0.125 µg/mL.

A Anfotericina B é um fármaco potencialmente nefrotóxico, pelo efeito vasoconstritor nas arteríolas renais aferentes, resultando em diminuição do fluxo sanguíneo glomerular e tubular. A diminuição da filtração glomerular provoca alterações de eletrólitos, levando à perda de potássio, retenção de íon hidrogênio, acidose tubular renal e hipomagnesemia. A ação nefrotóxica da anfotericina pode provocar anemia, em decorrência da inibição da síntese de eritropoetina, ou por ação direta sobre a medula óssea (CATÁLAN E MONTEJO, 2006) .

A farmacocinética da AmB na formulação convencional administrada por via intravenosa é bastante conhecida. O fármaco se distribui amplamente por vários tecidos, sendo que apenas 10% da dose permanecem no plasma. Seu volume de distribuição é de aproximadamente 4L/kg, o que caracteriza acúmulo extravascular do fármaco. Acumulam-se fundamentalmente no fígado, rins, pulmão, coração, músculos e glândulas adrenais. Liga-se fortemente às proteínas plasmáticas (90 a 95%) (GALLIS *et al.*, 1990; CIPOLLE, 1986).

Sua eliminação obedece a um comportamento bifásico, a meia vida em fase inicial é de 24 a 48 horas, seguida de uma fase terminal de 15 dias (GALLIS *et al.*, 1990; CIPOLLE, 1986). Apenas 3 a 5% do fármaco são eliminados na forma inalterada na urina (detectada 24 horas após a administração).

A baixa solubilidade da AmB em meio aquoso, sua alta toxicidade nas dispersões convencionais e a baixa taxa de absorção por via oral tem estimulado o desenvolvimento de novos sistemas de administração deste fármaco (ESPOSITO *et al.*, 2003; BRIME *et al.*, 2004).

Atualmente, com o advento dos sistemas de liberação de fármacos e o melhor entendimento das rotas alternativas de liberação, os pesquisadores, há alguns anos, revisitaram e questionaram alguns paradigmas estabelecidos como o caso da anfotericina B. O sucesso para uma forma de liberação oral para AmB deverá balancear a necessidade do aumento da absorção e ao mesmo tempo a proteção ácida à molécula, que é extremamente lábil, juntamente com a entrega de monômeros no sítio de ação. Com o número de pacientes que necessitam da terapia com AmB aumentando, é necessário que a ciência busque soluções para o desafio da administração oral de AmB.

Impacto das características físico-químicas de fármacos na farmacocinética e na elaboração da formulação

Estudos recentes demonstram que 75% dos candidatos a novos fármacos ou novos produtos farmacêuticos possuem baixa solubilidade e estão classificados como classe II ou IV no sistema de classificação biofarmacêutica (DI, *et al.*, 2009). Ainda, aproximadamente 40% dos produtos comercializados atualmente na forma de liberação imediata oral são categorizados como “praticamente insolúveis” (< 100 ug/mL) (TAKAGI *et al.*, 2006), como apresentados na figura 1.

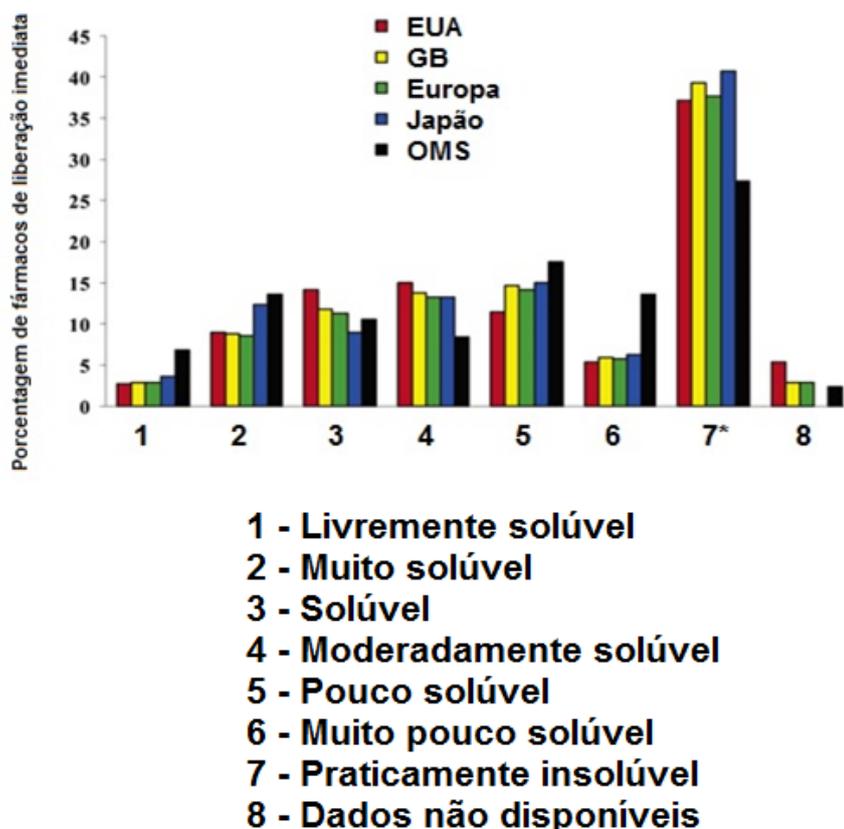


Figura 1 - Comparação de distribuição da solubilidade de fármacos em diversos países (TAKAGI, et al 2006).

A anfotericina B (AmB) é um antibiótico da classe dos polienos, isolado primeiramente em 1955 de fungos *Streptomyces nodosus* na Venezuela. A AmB é um potente agente antimicótico e antiparasitário e é o fármaco de escolha para o tratamento da leishmaniose visceral e principalmente contra infecções contra infecções fúngicas sistêmicas de *Candida albicans* e *Streptomyces fumigatus* em pacientes imunocomprometidos e imunossuprimidos (MENEZ, 2007). A AmB pertence à classe IV do sistema de classificação biofarmacêutica possuindo então limitada solubilidade em água e limitada absorção intestinal (IBRAHIM, 2013). Sua estrutura química está representada na figura 2.

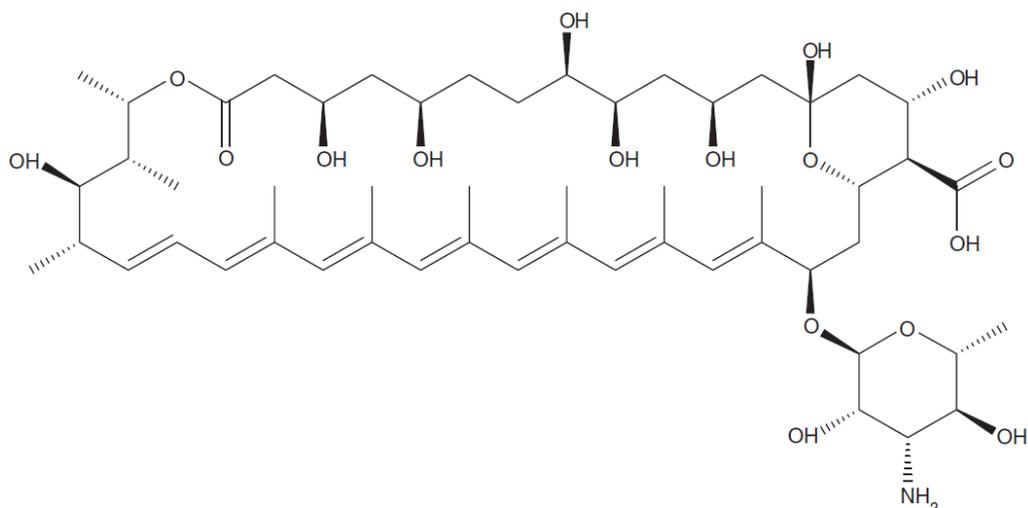


Figura 2 - Estrutura química da anfotericina B

Os fármacos de classe IV exibem propriedades moleculares mais desafiadoras – baixa solubilidade em água e baixa permeabilidade intestinal. Já que ambos os fatores são passos determinantes na absorção oral de um fármaco no organismo, sabe-se que fatores fisiológicos como, por exemplo, tempo de esvaziamento gástrico ou tempo de trânsito intestinal interfere de maneira significativa a absorção de moléculas da classe IV. Sendo assim, os fármacos de classe IV apresentam uma grande variabilidade intra e interindividual em termos de absorção oral, fato que torna o desenvolvimento de formulações para essa classe de fármacos especialmente complexo e desafiador (HORTER, 2001).

Sabe-se que existem inúmeras barreiras biológicas entre o local de administração de uma substância ativa e o seu correspondente sítio de ação e, em algumas situações, compostos farmacologicamente ativos veiculados por formas

farmacêuticas convencionais não conseguem atingir uma concentração satisfatória no seu sítio de ação (OLIVEIRA *et al.*; 2004).

Em alguns casos, é requerido um aumento da dose administrada até que o fármaco alcance a faixa de concentração plasmática para a ação terapêutica. Esse escalonamento de dose geralmente acarreta em uma toxicidade local no TGI após a administração oral, o que pode dificultar a adesão do paciente ao tratamento. Nestes casos, melhorar as características de absorção através da inovação incremental utilizando recursos farmacotécnicos pode minimizar os efeitos tóxicos locais e aumentar a eficácia terapêutica (HORTER, 2001).

Existem atualmente opções de formulação viáveis para contornar as barreiras criadas pela baixa solubilidade em água, resolvendo um dos problemas que os fármacos de classe IV apresentam. Todavia, abordagens para a melhoria da permeabilidade intestinal ainda estão em estágios iniciais de investigação e, portanto, não possuem estudos de segurança ainda bem estabelecidos. Nesse contexto, o desenvolvimento de formulação de uso oral para fármacos de classe IV é o mesmo comumente aplicado aos fármacos de classe II – aumento da solubilidade em água – mesmo que a absorção oral possa ser limitada posteriormente pela baixa permeabilidade intestinal dos fármacos de classe IV (KAWABATA, 2011). Na figura 3 está representado o sistema de classificação biofarmacêutica e os recursos que podem ser utilizados para melhorar a expectativa de absorção oral.

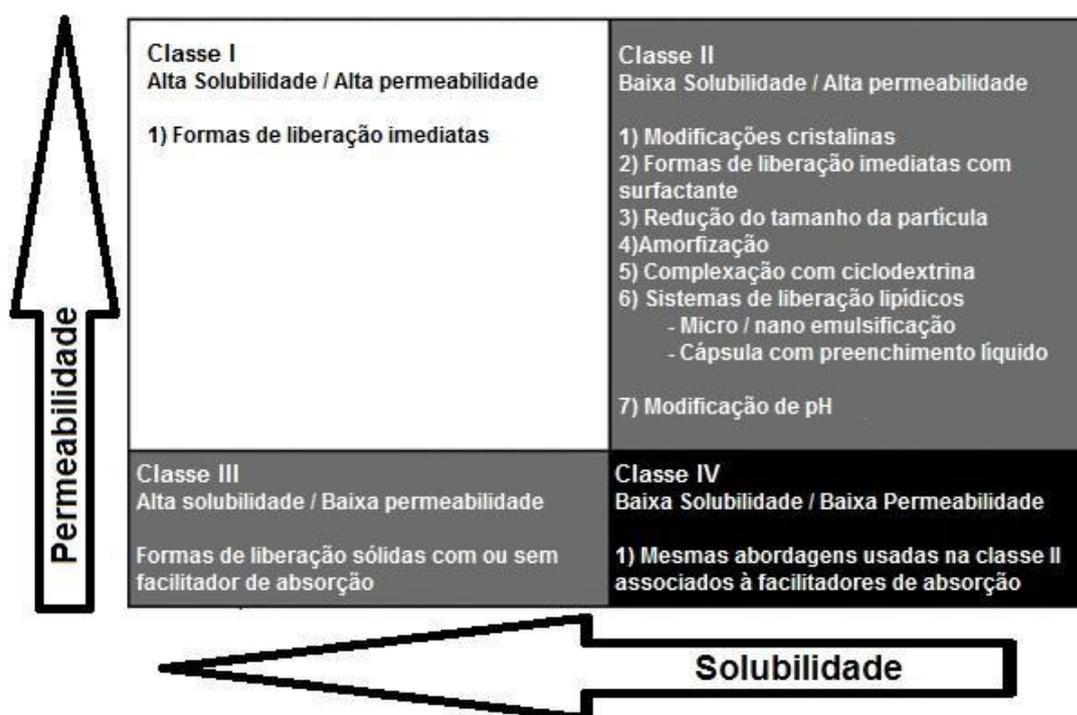
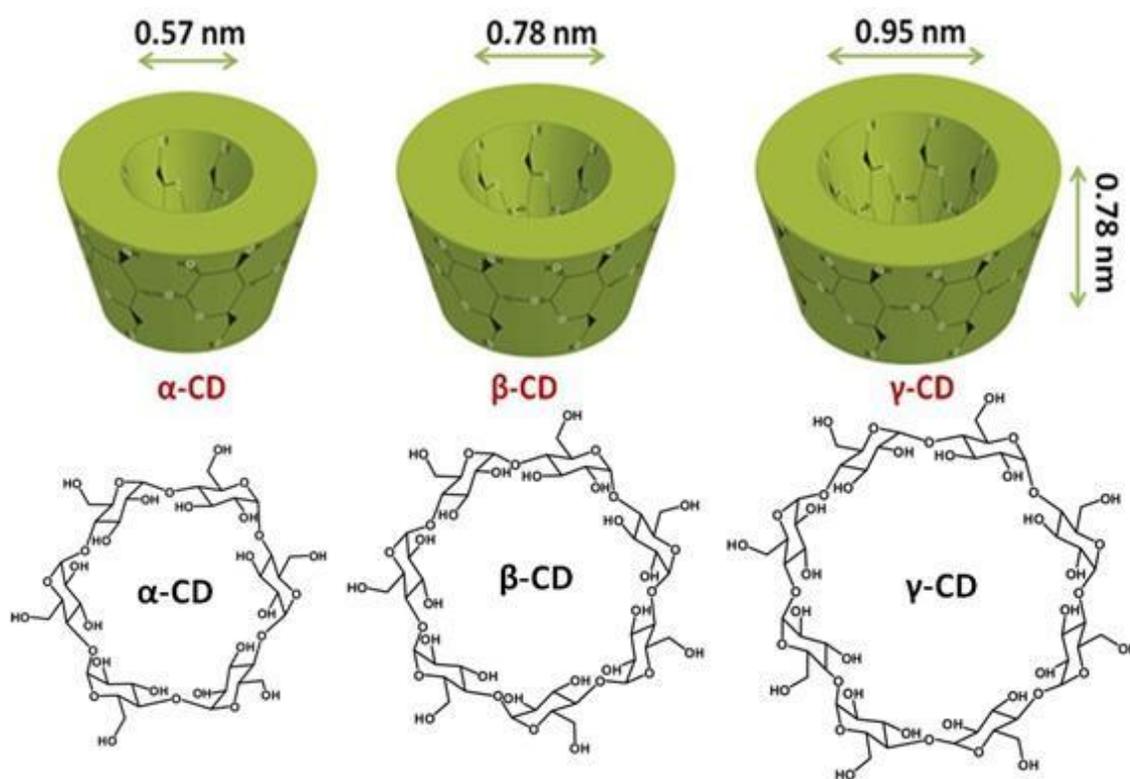


Figura 3 - Abordagens para a melhoria de características dos fármacos de acordo com sua classificação biofarmacêutica (KAWABATA, 2011)

Entre os recursos utilizados para melhorar as características de solubilidade de fármacos está a complexação com ciclodextrinas.

As ciclodextrinas são oligossacarídeos que contêm uma cavidade central relativamente hidrofóbica e uma superfície exterior hidrofílica (LOFTSSON, 1996) (Figura 4). Há três tipos de ciclodextrinas: α -CD, estrutura com 6 unidades de glicose, β -CD, estrutura com 7 unidades de glicose e γ -CD, com 8 unidades de glicose (Figura 4). As ciclodextrinas têm sido largamente utilizadas pela indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos produtos, e atualmente, existem mais de 10 produtos comercializados utilizando a ciclodextrina em sua composição (KAWABATA, 2011). As ciclodextrinas e seus derivados aumentam a hidrossolubilidade aparente dos fármacos através da formação de complexos de

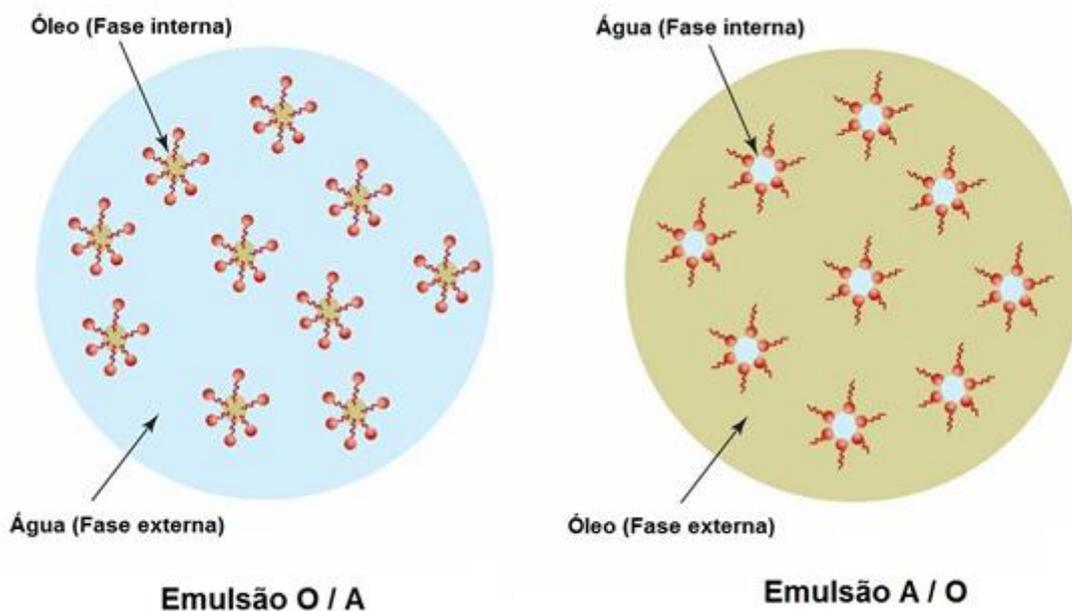
inclusão. Um grande número de estudos tem demonstrado o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos com baixa solubilidade em água através da formação de complexos de inclusão de ciclodextrina (RAJEWSKI, 1996). Tem sido reportado que a simples mistura física de fármacos e ciclodextrinas per se não traz aumento de biodisponibilidade após a administração oral. Todavia, após a complexação fármaco - ciclodextrina, tem sido demonstrado que há um aumento de área sob a curva (ASC) de 1,1 a 46 vezes quando comparadas à formulações como fármacos em forma cristalina ou liofilizada (BREWSTER, 2007).



extraído de <http://unam.bilkent.edu.tr/~uyar/Research.html>

Figura 4 - Representação gráfica e estrutura química geral dos principais subtipos de CD

Nos últimos anos, os sistemas de emulsificação têm sido também amplamente utilizados para aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos com pouca solubilidade em água, especialmente no caso das moléculas altamente lipofílicas. Essas formulações são caracterizadas pela formação de misturas óleo / água finamente dispersadas após agitação moderada, na presença de tensoativos e cotensoativos. As emulsões são classificadas a partir do tamanho das gotas dispersas na fase externa, variando de microemulsões a nanoemulsões (chegando até menos de 100nm de diâmetro) (KOHLI *et al.*, 2010). De acordo com o tamanho das gotículas dispersas no meio, a extensão da absorção também varia, já que a superfície de contato fármaco – parede intestinal é tão maior quanto menor a gotícula dispersa na emulsão. Alguns produtos farmacêuticos como o Neoral® demonstram aumento expressivo de concentração máxima após a administração (C_{max}) e ASC quando comparada à formulações convencionais (MUELLER, 1994).



adaptado de <http://nsb.wikidot.com/c-9-5-5-4>

Figura 5 - Representação esquemática dos tipos de microemulsões

Para se avaliar o impacto dessas mudanças traduzidas na absorção é possível realizar estudos preliminares, caso necessário, da biodisponibilidade oral teórica advinda das alterações no produto. Para tanto, um simples estudo de estabilidade metabólica e permeabilidade celular em células Caco-2 fornecem dados suficientes, que quando plotados, indicam a probabilidade de se atingir baixa, média ou alta biodisponibilidade após a administração oral. Esse método foi validado a partir de estudos com fármacos de referência, se provando uma estimativa útil de diferentes compostos baseados na sua posição no mapa traçado (RITCHIE, 2011) como representados na figura 6.

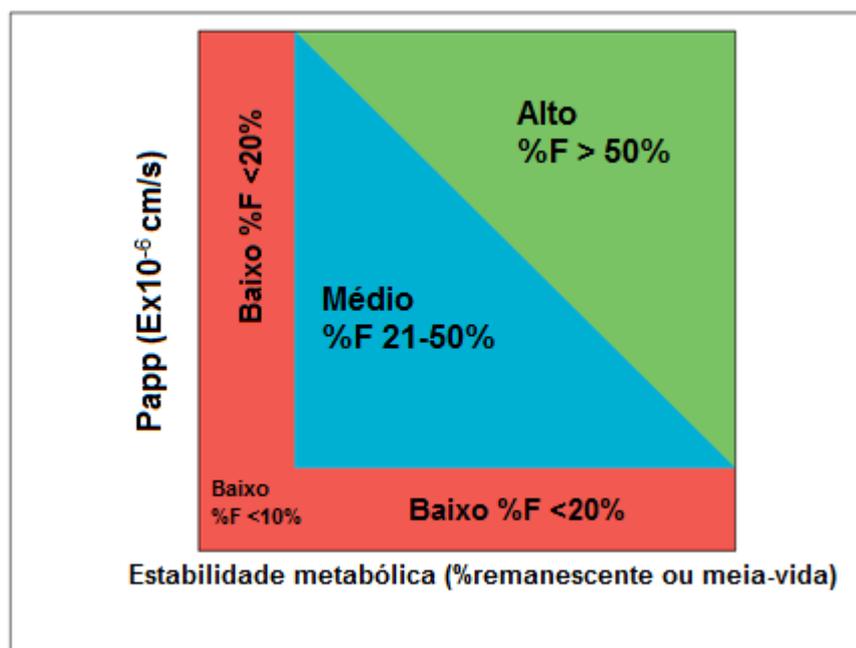


Figura 6 - Modelo gráfico para estimativa de biodisponibilidade oral e permeabilidade celular. Adaptado de Ritchie, 2011.

Considerando-se o aumento da biocompatibilidade e melhoria na solubilidade aparente do fármaco concedido pela utilização das microemulsões, Pestana (2008) realizou o desenvolvimento e caracterização de uma microemulsão biocompatível para a veiculação da anfotericina B utilizando-se 63% de fase aquosa, 17% de fase oleosa e 20% de tensoativos, incorporando 5,81 mg/mL do fármaco. Além do estudo farmacotécnico do sistema microemulsionado, Pestana realizou ainda o estudo de seu perfil farmacocinético. Esse sistema microemulsionado apresentou um incremento de biodisponibilidade oral de aproximadamente 5% da formulação comercial para 10% administrando-se uma dose de 50mg/kg e não apresentando os

efeitos nefrotóxicos quando comparada à mesma administração da formulação comercial com desoxicolato. O aumento na biodisponibilidade oral apresentado pela formulação desenvolvida por Pestana para a anfotericina B foi um resultado que incrementou o interesse na pesquisa e desenvolvimento de formulações com esse intuito, já há muito buscado pela comunidade científica, a fim de diminuir seus efeitos tóxicos apresentados na administração intravenosa desse fármaco.

Franzini (2010) desenvolveu e caracterizou uma formulação que une as características de melhora da absorção de fármacos concedidas pelos sistemas microemulsionados estudados por Pestana (2008) com a capacidade de solubilização dos fármacos adquirida através da complexação da anfotericina B com diversos subtipos de ciclodextrinas.

Nos estudos de caracterização da formulação foi possível observar uma diminuição de aproximadamente 2,5 vezes – de 243 para 91nm – o diâmetro das gotículas contendo AmB com o aumento gradual na proporção dos tensoativos utilizados na produção do sistema. Essa alteração levou a um aumento na estabilidade do sistema, o tornando termodinamicamente estável.

Quando o sistema foi submetido ao stress com elevação da proporção de fase oleosa (fase interna) e manutenção das proporções de tensoativos, o inverso foi observado, aumentando-se o diâmetro das gotículas formadas no sistema. Ainda, foram realizados testes para a quantificação da incorporação de AmB em relação às proporções de tensoativo e fase interna. O gráfico obtido nesse estudo demonstrou que a solubilização da AmB é diretamente dependente tanto do volume de fase oleosa quanto de tensoativo utilizados na produção do sistema (Figura 7). Sendo assim, esses dois componentes apresentam um papel fundamental nos parâmetros de incorporação de AmB no sistema microemulsionado.

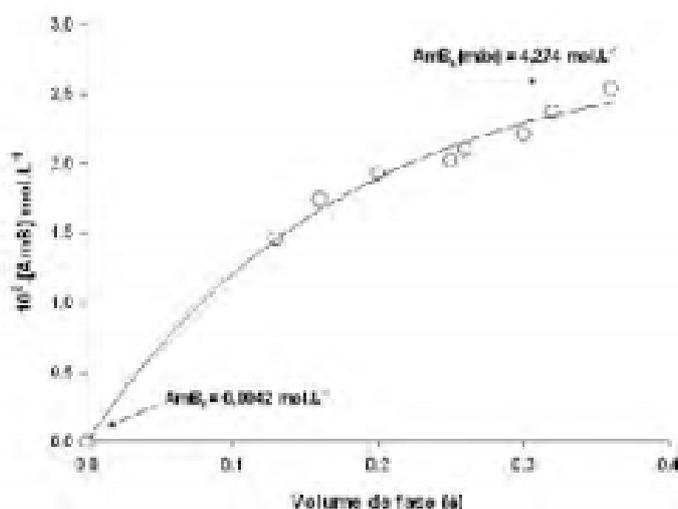


Figura 7 - Efeito do volume de fase da ME na incorporação de AmB a 25 C. Franzini, 2010.

O fenômeno de incorporação de fármacos em MEs pode ser direcionado pela partição da AmB nas gotículas da fase oleosa que dependem da interação hidrofóbica entre o fármaco e as gotículas (OLIVEIRA et al., 2009). Tendo a AmB uma extensa cadeia carbônica sugere-se um aumento de sua solubilidade em sistemas com volumes de fase interna mais elevados, pois uma afinidade deve ser estabelecida. A concentração de AmB aumentou conforme o volume de fases foi aumentado, apresentando um fator de solubilidade (S_{∞}) em torno de 1000 quando comparado com a solubilidade intrínseca do fármaco em água (FRANZINI, 2010).

Diante das características físico químicas inadequadas à absorção oral da AmB, a associação do sistema microemulsionado e complexação com CD cria expectativas de alterações nessas características para viabilizar a administração deste fármaco por esta via.

Fundamentação teórica da Farmacocinética populacional e o impacto da farmacometria nas decisões regulatórias

Gradativamente vem sendo reconhecido o valor da racionalização quantitativa no desenvolvimento de novos fármacos e a sua revisão regulatória. A modelagem e simulação de dados referentes à farmacocinética, farmacodinâmica e progressão de doenças é comumente chamada de farmacometria. O já conhecido *mantra* atual do Food and Drugs Administration (FDA) “o fármaco certo na dose certa, com intervalo e dosagem certos” é o que levou essa entidade a utilizar extensivamente a modelagem e simulação em suas decisões. A agência tem apresentado uma preocupação constante com o aumento nos custos e estagnação do desenvolvimento de fármacos em sua publicação “*Challenge and Opportunity on the Critical Path New Products*” de Março de 2004 (ETTE, 2007). O FDA utiliza a farmacometria para a revisão dos pedidos de registro de novos fármacos e também para a orientação das empresas quanto ao desenvolvimento do processo de regularização através de reuniões especialmente durante a Fase IIa (BONATE, 2011).

O uso da modelagem e simulação em farmacocinética, usualmente chamado apenas de farmacocinética populacional, evidencia correlações entre fatores fisiológicos e parâmetros farmacocinéticos úteis à individualização da dose e à previsão do comportamento do fármaco após uma administração através de simulações *in silico*, prevendo os riscos que um novo tratamento venha a apresentar (MOULD, 2012).

Alguns dos muitos exemplos conhecidos de fármacos aprovados pelo FDA utilizando-se modelagem e simulação foram:

- Everolimus: Empresa necessitava apresentar um regime de dose que minimizaria a toxicidade renal do fármaco. A modelagem e simulação foi utilizada para proporcionar uma dose para os futuros testes clínicos (BONATE, 2011).
- Degarelix: O aplicante desenvolveu um modelo mecanístico de farmacocinética / farmacodinâmica utilizado para explorar estratégias de doses em pacientes com câncer de próstata. A simulação foi utilizada para solucionar dúvidas da agência regulatória que levaram à aprovação do fármaco (BONATE, 2011).
- Tacrolimus: O desenvolvimento de um modelo logístico de regressão utilizando a exposição ao fármaco como covariável mostrou que concentrações marginais mínimas eram um bom preditor de desfechos clínicos. Dessa forma, o modelo permitiu a justificativa de ajuste de dose mínima em estudos de Fase 3 (BONATE, 2011).
- Pediatria: Uma empresa desejava utilizar um fármaco em crianças já aprovado e em uso terapêutico em adultos. Utilizando um modelo de exposição-resposta advindo de estudos clínicos em adultos, o FDA determinou a dose apropriada para crianças e neonatos (BONATE, 2011).

Outros exemplos de fármacos que utilizaram da farmacocinética populacional para aprovação encontram-se listados na tabela 1.

Tabela 1 - Fármacos aprovados que utilizaram a farmacometria em seus estudos reulatórios

Fármaco	Covariáveis ou Medicções
Adalimumab	Imunogenicidade e idade
Akakinra	Peso
Alosetron	Dose e gênero
Aripripazol	Gênero, etnia e uso de tabaco
Busulfan	Uso de tabaco, pacientes pediátricos
Daptomicina	Função renal
Delaviridina	Co-administração com cetoconazol
Fexofenadina	Pacientes geriátricos, insuficiência renal e hepática
Galantamina	Co-administração com fluoxetina
Pramipexol	Co-administração com cimetidina
Rifapentina	Gênero
Rosuvastatina	Etnia
Tiagabina	Co-administração com carbamazepina
Valganciclovir	Pacientes transplantados de fígado, rins e coração

Extraído de Zhou, H. Population-based assessments of clinical drug-drug interactions: Qualitative indices or quantitative measures. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2006

Para a modelagem em farmacocinética populacional, há uma variedade de modelos de regressão matemáticos que podem ser utilizados para descrever como a resposta de uma variável se altera dependendo de covariáveis. Ao se aumentar, por exemplo, a ordem de um modelo polinomial pode-se obter aproximações gradativamente precisas, porém *somente no intervalo observável dos dados*. Esses modelos empíricos são baseados somente na relação observada e a resposta de covariáveis e não incluem qualquer consideração teórica quantos aos mecanismos subjacentes a esse modelo matemático (PINHEIRO; BATES, 1995).

Modelos de efeitos mistos não lineares (NLME) por outro lado são na maioria das vezes, mecanísticos, baseados, por exemplo, em um modelo para o mecanismo produzindo a resposta. Como consequência, os parâmetros presentes nos modelos

não-lineares geralmente têm uma interpretação física natural. Ainda que derivados empiricamente, modelos de efeitos mistos não lineares usualmente incorporam características teóricas conhecidas dos dados, tais como assíntotas e monotonicidades. Modelos não lineares além de possuírem um número menor de parâmetros, possuem robustez suficiente para se realizar previsões além da área observável dos dados. Essa situação resulta em uma descrição mais parcimoniosa dos dados comparados aos modelos polinomiais (Figura 8). Apesar da grande flexibilidade desses modelos, os mesmos não vêm sem um custo. Já que os efeitos randômicos ou aleatórios são permitidos de entrar no modelo de forma não-linear, a função marginal de probabilidade, obtida pela integral da densidade da resposta e dos efeitos aleatórios não possui uma forma fechada em seu cálculo para a estimativa dos parâmetros. Esse fato leva a algoritmos de estimativa com um intenso custo computacional. (PINHEIRO; BATES, 2000).

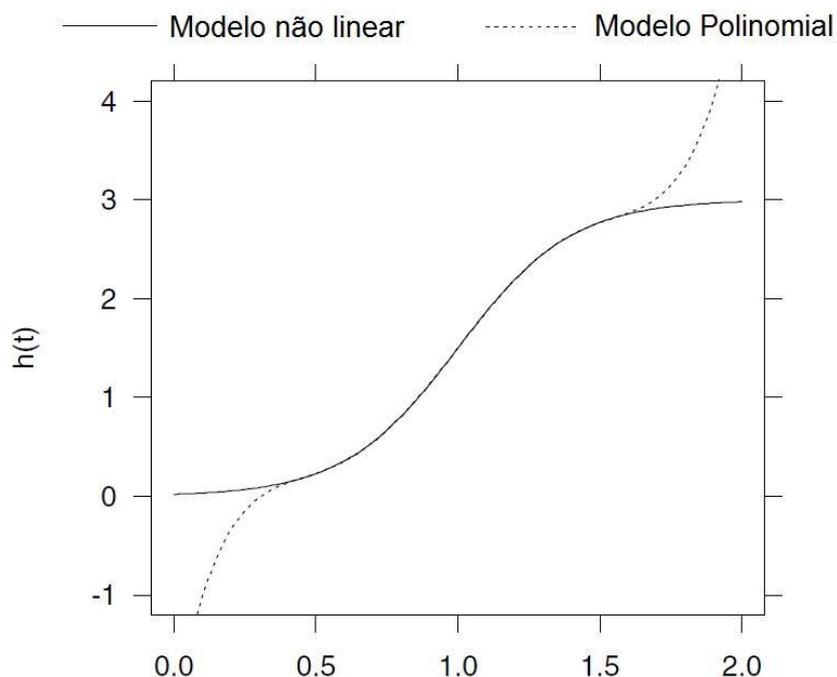


Figura 8 - Diferença dos modelos polinomiais e NLME's (PINHEIRO & BATES, 1995)

Para os NLME, “Não-linear” se refere ao fato de que a dependente variável (ex. concentração) é não-linearmente relacionada aos parâmetros do modelo e suas variáveis independentes. “Efeitos mistos” se referem à parametrização: parâmetros que não variam entre os indivíduos, representados pelos parâmetros populacionais, são referidos como efeitos fixos (fixed effects). Os parâmetros que variam entre os indivíduos, são chamados de efeitos aleatórios (random effects) (BONATE, 2011).

O desenvolvimento de um estudo em farmacocinética populacional inicia-se na execução experimental com diferentes indivíduos e a coleta de dados que sustentarão estimativas iniciais dos parâmetros farmacocinéticos. A partir destas informações, é possível calcular o número de indivíduos necessários à execução do estudo de farmacocinética populacional completo que proporcionará a previsão de

influencia das covariáveis individuais sobre a disposição cinética e, conseqüentemente, sobre o desfecho clínico.

Existem cinco aspectos principais no desenvolvimento de um modelo de farmacocinética populacional: (I) dados, (II) modelo estrutural, (III) modelo estatístico, (IV) modelo de covariáveis e (V) software de modelização (BONATE, 2011).

Os modelos estruturais (II) descrevem o perfil de concentração plasmática vs tempo típico dentro da população. Já os modelos estatísticos (III) representam a variabilidade randômica, ou “inexplicável” nas concentrações dentro da população (variações inter-sujeito, variações entre ocasiões, erros residuais, etc.). Os modelos de covariáveis (IV) descrevem a variabilidade predita por características fisiológicas dos indivíduos (covariáveis) (MOULD, 2012).

Dessa maneira, utilizando-se a farmacocinética populacional é possível trazer à tona um número maior de respostas quanto ao impacto de características individuais que usualmente afetam o perfil farmacocinético. Essas correlações são muito importantes quando há a administração de novos fármacos ou durante o planejamento de um novo regime posológico, alertando para diferenças no perfil farmacocinético, tais como idade, peso ou área corporal, gênero, fatores genéticos que afetam o clearance de fármacos metabolizados por isoformas polimórficas de enzimas do CYP450, dentre muitos outros fatores. Além disso, é possível utilizar diferentes ocasiões ou tratamentos como covariáveis, permitindo encontrar diferenças entre os mesmos utilizando-se os modelos farmacocinéticos (GEHRARD, 1994). Os modelos mistos não lineares aplicados à farmacocinética têm como estrutura geral o gráfico apresentado na figura 9.

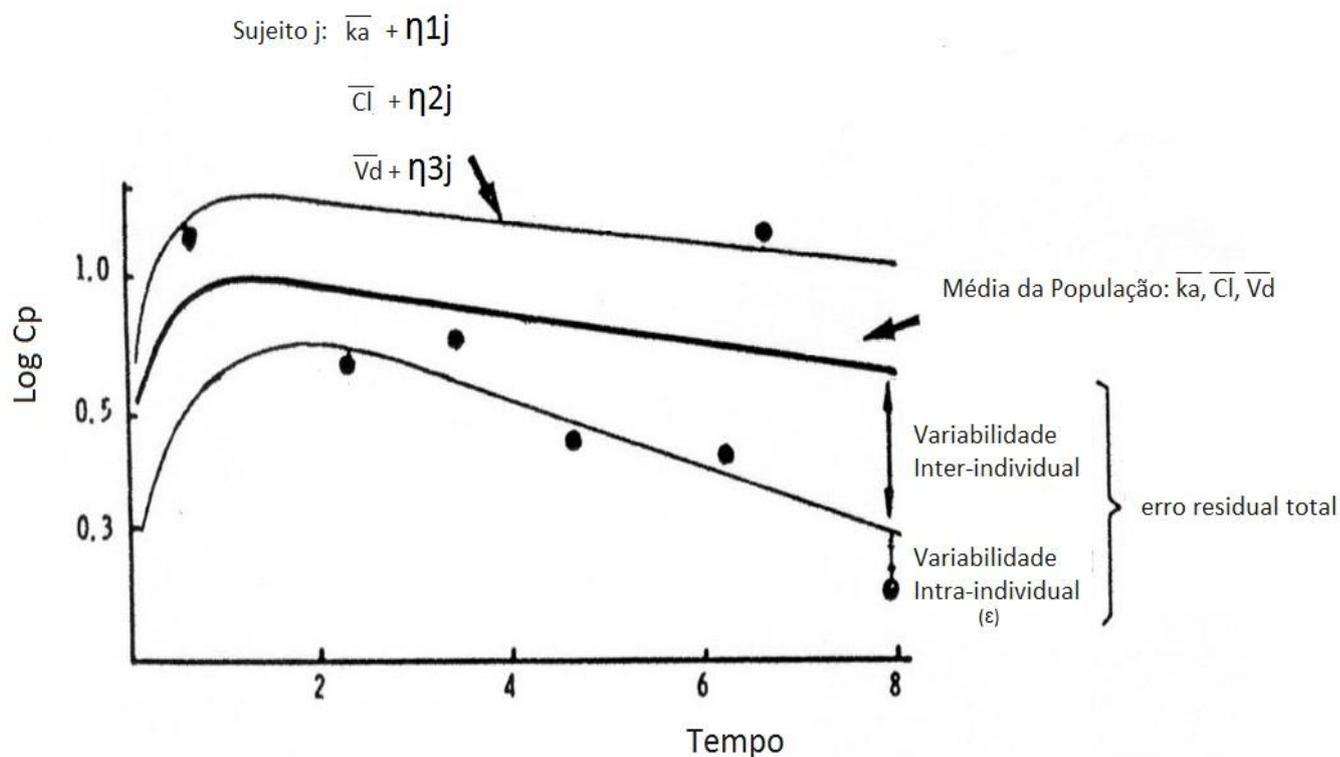


Figura 1 - Estrutura geral dos NLME's (adaptado de Vozech, 1982)

Em um sentido mais amplo, a modelagem matemática e simulação *in silico* implica em quantificar processos biológicos para que os endpoints experimentais possam ser comparados e testados. Ainda, é possível que estudos *in vitro* e *in vivo* sejam ligados aos modelos e inferências populacionais possam ser feitas a partir das modelagens matemáticas. Essas análises *in silico* permitem então a simulação de processos biológicos e farmacológicos, ferramenta essa que reduz drasticamente a necessidade da condução de diversos estudos exploratórios *in vivo*, permitindo-se

definir estudos mais específicos para validar o modelo ou os mecanismos elucidados por ele (BONATE, 2011).

3 - OBJETIVOS

Objetivos Gerais

-Análise farmacocinética e avaliação preliminar de toxicidade da anfotericina B veiculada por nova formulação microemulsionada comparada à formulação comercial (desoxicolato) e construção de um modelo para avaliação *in silico* das características farmacocinéticas relacionadas à formulação e ao modelo animal.

Objetivos Específicos

- Validação parcial de método analítico para quantificação de anfotericina B;
- Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para a quantificação de anfotericina B;
- Análise Farmacocinética após a administração intravenosa de anfotericina comercial;
- Análise Farmacocinética após a administração intravenosa de anfotericina veiculada pelo novo sistema microemulsionado;
- Análise Farmacocinética após a administração oral de anfotericina veiculada pelo novo sistema microemulsionado;
- Análise de parâmetros bioquímicos renais – ureia e creatinina – após as administrações de anfotericina B;
- Construção e validação do modelo de PK populacional para análise de covariáveis *in silico*.

4 – Materiais e Métodos

4.1 – Materiais

4.1.1. Matérias primas, reagentes e solventes

- Acetonitrila, J. T. Baker, USA;
- Metanol, J. T. Baker, USA;
- Ácido Fórmico 98%, Scharlau, Alemanha;
- Água ultrapura (sistema Milli-Q)
- Anfotericina B, Sigma-Aldrich, USA;
- Colesterol, Sigma-Aldrich, USA;
- Colesterol, Vetec, Argentina;
- Fosfatidilcolina de soja, (Epikuron®200), Lucas Meyer, Alemanha;
- Nifedipina, Sigma-Aldrich; USA
- Oleato de sódio, Sigma-Aldrich, USA;
- β -ciclodextrinas, (Cavamax W7®), ISP Technologies, USA.38
- Tween 20;
- Heparina sódica (Hepamax-S®), Blau, Brasil;
- Cetamina (Ketamina Agener®), União Química, Brasil;
- Soro fisiológico (Equiplex®), Brasil;
- Xilazina (Calmiun®), União Química, Brasil;

4.1.2. Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento (Ethiktechnology);
- Balança Analítica AY 220 (Shimadzu);
- Banho Ultrassônico Ultrasonic Cleaner 284ODA (Odontobrás);
- Detector de UV-visível Waters®;
- Centrífuga de microtubos Gilson;
- ULPC Acquity® Waters;
- Ultracentrífuga Sorvall Biofugue Stratos (Thermo Scientific);
- Sonicador de haste –XL2020TM Ultrasonic Liquid Processor®;
- Vórtex AP 56 (Phoenix Luferco).

4.1.3. Correlatos

- Coluna CSHTM C18 (2,1 x 100mm, 1,7µm);
- Coluna de guarda CSH C18 (2,1 x 5mm, 1,7µm);
- Filtro de seringa PTFE, poro de 0,22µm (Flowsupply);
- Seringa 1 mL BD®.

4.1.4. Software

- Phoenix WinNonLin (Pharsight)
- Suite Phoenix® NLME v 1.3
- Microsoft Excel 2010
- Empower 3 (Waters®);
- Gen 5, versão 2.00 (Biotek®);

- Graphpad Prism®, versão 5;
- Origin®, versão 7.

4.2 Equipamentos e sistema cromatográfico

No método bioanalítico desenvolvido foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de ultra eficiência Acquity Waters UPLC® Class H. A nifedipina foi utilizada (20µg/mL em acetonitrila) como padrão interno (PI). A fase móvel composta por Acetonitrila : Ácido fórmico 0,1% (38:62; v/v), a um fluxo de 0,4mL/min em modo isocrático foi utilizada para a eluição dos compostos no sistema cromatográfico. A separação foi realizada através da passagem da amostra sob ação da fase móvel em coluna ACQUITY UPLC CSH C18 (Charged Surface Hybrid), 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 30 mm. A detecção foi realizada através de um detector UV-Visível Acquity® Waters TUV. Para a identificação de ambos os compostos o comprimento de onda utilizado foi de 407 nm, absorção máxima da anfotericina B.

4.3 Preparo da solução comercial AmB desoxicolato (Anforicin®)

O pó liofilizado (10mg) foi adicionado de 10mL do diluente, conforme especificado pelo fabricante. A formulação recém preparada foi utilizada imediatamente.

4.4 Preparo da Solução de AmB- β -CD

Foi preparada uma solução de β -CD à 13 mmolar que permaneceu em banho ultrassônico por 20 minutos. Após retirada do banho, adicionou-se AmB até a concentração de 10 mg/mL, mantendo-se em agitação por 72 horas. Após homogeneização, a solução foi submetida a centrifugação à 6.000 x g por 15 minutos, sendo a fase aquosa da microemulsão a AmB solubilizada em β -CD.

4.5 Preparo da Formulação AmB-ME

As ME foram obtidas misturando-se FS/TW/OS (33:33:33 p/p) em fase oleosa (CO) em proporções previamente estabelecidas, sendo elas 10% de FS/TW/OS, 5% CO e 85% de água. Após a adição da fase aquosa, a AmB foi incorporada e o sistema foi submetido à ultrassom de haste em modo descontínuo por 20 minutos.

Após a sonicação, o sistema foi centrifugado a 6.000 x g por 15 minutos, a fim de remover quaisquer resíduos de titânio proveniente do sonificador de haste, além de possíveis quantidades de AmB em excesso.

4.5.1 Estudo de incorporação da formulação

Para determinar a concentração de incorporação da AmB na ME, a formulação foi diluída em água Milli-Q em diluição de 1:1000, e analisada no sistema cromatográfico. Todas as análises foram realizadas em triplicata e foi calculada a incorporação a partir da equação da curva analítica da AmB.

4.6 Processamento da amostra biológica

Em um microtubo plástico de 1,5 mL contendo 100µL de plasma, foram adicionados 100µL de acetonitrila previamente contendo nifedipina (padrão interno) na concentração de 20µg/mL. Em seguida, a amostra foi agitada em vortex por 30 segundos e centrifugada a 15000x g por 20 minutos. 125 µL do sobrenadante foram filtrados em filtro de seringa de 0,22µm e 5 µL foram injetados no sistema cromatográfico.

4.7 Validação

A validação compreende a avaliação sistemática dos procedimentos utilizados no método bioanalítico desenvolvido com a finalidade de estabelecer os seus limites de confiança. Esta avaliação foi fundamentada nas normas do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de acordo com a resolução RE-nº 899, de 29 de maio de 2003 e RDC 27, de 17 de maio de 2012 além da Food and Drug Administration (FDA), de acordo com o Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, de maio de 2001.

4.7.1 Linearidade

As curvas bioanalíticas foram construídas através das relações entre a razão da área dos picos de cada composto e do PI (área do composto/área do PI) contra a

concentração nominal do composto. Os critérios de aceitação da linearidade incluíram coeficiente de correlação acima de 0,98 e exatidão de 85% a 115%, exceto para LIQ, no qual a exatidão deve estar compreendida entre 80 e 120%.

Curva analítica

Foi construída uma curva analítica incluindo sete níveis de concentrações (na faixa entre 0,5 a 10 µg/mL) para quantificação da AmB em solução aquosa. O ensaio foi realizado em quintuplicata e o método foi considerado linear, apresentando o coeficiente de variação menor que 5% e o critério mínimo aceitável de correlação (r) superior a 0,99.

Curva bioanalítica

Uma curva bioanalítica (50 a 1000 ng/mL) foi construída para a quantificação da AmB em plasma, incluindo níveis de seis concentrações. O ensaio foi realizado em quintuplicata e o método é considerado linear, se apresentar coeficiente de variação menor a 15% e o critério mínimo aceitável de correlação (r) superior a 0,99.

4.7.2 Limite inferior de quantificação (LIQ)

O LIQ é expresso como a menor concentração do analito que pode ser quantificada com exatidão de 80-120% e precisão de 0-20%. O limite inferior de quantificação é obtido através de análises de matrizes biológicas de concentrações decrescentes até atingir o menor nível quantificável em 5 replicatas.

4.7.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade entre os resultados obtidos na curva de calibração. A precisão foi determinada em uma mesma corrida e analisada em um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (precisão intracorrída ou repetibilidade) e, ainda, foi determinada em dias diferentes, utilizando equipamento diferente em três corridas diferentes (precisão intercorrída ou reprodutibilidade) em cinco replicatas das concentrações: 50 ng/mL (limite inferior de quantificação), 100 ng/mL (controle de qualidade baixo), 250 ng/mL (controle de qualidade médio), 750 ng/mL (controle de qualidade alto) e 500 ng/mL (controle de qualidade de diluição). A precisão é expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) e não se admite valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, onde são aceitos valores menores ou iguais a 20%.

4.7.4 Exatidão

A exatidão representa a proximidade dos resultados obtidos no método em estudo em relação ao valor nominal. A exatidão foi determinada em uma mesma corrida analisada em um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (exatidão intracorrída ou repetibilidade) e, ainda, foi determinada em dias diferentes, utilizando equipamento diferente em três corridas diferentes (exatidão intercorrída ou reprodutibilidade) em cinco replicatas das concentrações: 50 ng/mL (limite inferior de quantificação), 100 ng/mL (controle de qualidade baixo), 250 ng/mL (controle de qualidade médio), 750 ng/mL (controle de qualidade alto) e

500 ng/mL (controle de qualidade de diluição). A exatidão é expressa pelo erro padrão relativo (EPR), não se admite valores fora da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ onde se admitem valores inferiores ou iguais a 20%.

4.7.5 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado nas condições experimentais previamente estabelecidas. O LD foi determinado pela relação de 3 vezes o ruído da linha de base na amostra de plasma branco.

4.7.6 Recuperação

Para o estudo de recuperação foram realizadas diluições de anfotericina B apropriadas em concentrações nominais dos controles de qualidade nos extratos brancos de plasma, comparando-se com o procedimento de extração que foram empregados nas amostras. A recuperação foi calculada com base no percentual da razão área analito/área pi extraído contra razão área analito/área PI de soluções criadas no extrato final e injetadas no sistema analítico.

4.7.7 Estabilidade

A estabilidade foi avaliada em função da necessidade de armazenamento das amostras após cada coleta ou após processamento. Os ensaios de estabilidade determinam o tempo máximo de armazenamento com a garantia de resultados confiáveis.

Foram realizados os ensaios de estabilidade de curta duração, no qual o CQ foi mantido à temperatura ambiente no período de 6 a 24 horas; estabilidade pós-processamento, no qual avaliamos o fármaco no extrato final obtido após processamento da amostra no período de 24h; estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento, no qual o CQ foi congelado por 24 horas e descongelado à temperatura ambiente por três vezes. Os experimentos foram realizados utilizando-se o CQA (750 ng/mL) e o CQB (100 ng/mL).

Os compostos foram considerados estáveis quando não observado desvio maior que 15% do valor obtido com relação às amostras recém preparadas.

4.7.8 Controle de qualidade diluído (CQD)

Deve ser preparada uma amostra com a matriz biológica em uma concentração acima da curva de calibração, ou seja, acima do limite superior de quantificação (LSQ), e deve-se diluir essa amostra a ponto que a concentração final seja um valor que se encontra na curva de calibração. Sendo assim, foi preparada uma amostra na concentração de 10 µg/mL e diluída a 1 µg/mL e analisada. O resultado obtido deve apresentar exatidão e precisão de $\pm 15\%$.

4.7.9 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada em relação a outros compostos presentes na matriz biológica utilizada, neste caso, plasma de ratos. Desta forma, a seletividade foi avaliada através de amostras de plasma branco coletadas anteriormente à administração e coletas dos experimentos para verificar se xenobióticos utilizados durante a intervenção cirúrgica para implantação de cânulas presentes no plasma poderiam eluir no mesmo tempo de retenção do fármaco e / ou do padrão interno.

4.7.10 Efeito matriz

A avaliação do efeito matriz tem como objetivo determinar se os componentes da matriz biológica interferem na resposta do sistema ao analito ou ao padrão interno. Foram utilizadas amostras de plasma adicionadas do analito e do padrão interno, sendo quatro amostras de plasma normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas, nas concentrações do CQB e do CQA, comparando com as mesmas concentrações em soluções analíticas. Para cada amostra deve ser obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN). O critério de aceitação utilizado foi o coeficiente de variação do FMN, relativo a todas as amostras, inferior a 15%.

4.7.11 Efeito residual ou Carryover

O efeito residual é a avaliação do aumento de sinal tanto do analito quanto do padrão interno causado por “contaminação” do sistema em decorrência de análises

anteriores. O efeito residual foi determinado por três injeções da amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção da amostra do limite superior de quantificação (LSQ) – 1000 ng/mL. Os resultados foram comparados com os obtidos do limite inferior de quantificação (LIQ). As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do LIQ e de 5% da resposta do PI.

4.7.12 Análise dos resultados da validação

Os cálculos de regressão linear, desvio padrão relativo (DPR) e exatidão foram realizados utilizando-se o software Origin® e o Microsoft Excel 2010.

4.8 Perfil Farmacocinético

4.8.1 Animais

Foram utilizados ratos wistar (n=27), com peso aproximado de 250 g provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista – Unesp. Os animais foram transferidos para o biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia (PANT) da UNESP Araraquara, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade ($55 \pm 5\%$) e ciclos de luz de 12/12h, com luzes acesas as 07h. Ração balanceada e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados na fase de claro.

4.8.2 Protocolo experimental

O protocolo de experimental executado neste projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara sob os pareceres de números 62/2013 (Anexo)

Foram utilizados 27 animais, distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo 1 – Anfotericina B desoxicolato – 11 animais receberam dose única (1 mg/kg) em infusão lenta de AmB-desoxicolato, disponível comercialmente (Anforicin®), por via intravenosa ($v = 100\mu\text{L}$);

Grupo 2 – Anfotericina microemulsão – 11 animais receberam dose única (1 mg/kg) de AmB incorporada na ME por infusão lenta via intravenosa ($v = 100\mu\text{L}$);

Grupo 3 – Anfotericina microemulsão – 5 animais receberam dose única (10 mg/kg) de AmB incorporada na ME por via oral ($v = 200\mu\text{L}$).

Em todos os grupos, as coletas foram realizadas através de cânulas previamente implantadas na veia femoral, para a administração de AmB, e artéria femoral, para a coleta de sangue. As cânulas foram externalizadas no dorso do animal, de onde os procedimentos eram realizados. Os animais foram submetidos ao processo cirúrgico de implantação e mantidos em recuperação por 24 horas após a intervenção.

Nestes animais foram administrados AmB desoxicolato e AmB microemulsão através de injeção na cânula venosa. As coletas foram realizadas através da

abertura das cânulas arteriais para que ocorresse o fluxo do sangue nos tempos de 5, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480, 720, 1440 e 2880 minutos após a administração e para a via oral nos tempos de 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 480, 720, 1440 e 2880 minutos. A partir desses dados foi possível avaliar o perfil farmacocinético das formulações de Amb administradas pela via intravenosa, e no grupo 3 avaliar o perfil na administração oral da ME.

4.8.3 Análise farmacocinética

A disposição cinética da AmB em ambas as formulações foi avaliada após as administrações dose única intravenosa por infusão lenta nos animais e da administração de dose única por gavagem da AmB veiculada pela ME, nos softwares Microsoft Excel® e Phoenix Winonlin®. Os resultados obtidos permitiram a utilização do modelo bicompartimental para a análise farmacocinética.

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados através das curvas de concentração plasmática *versus* tempo. A constante de velocidade eliminação (β) foi determinada através da inclinação das retas de regressão linear do logaritmo das concentrações plasmáticas *versus* tempo.

A ASC_{0-t} foi calculada pelo método dos trapezoides, onde a média das concentrações plasmáticas de cada intervalo de tempo é multiplicada por esse intervalo de tempo, com subsequente soma de todos os intervalos (Equação 1)

$$\text{Equação 1} \quad ASC_{0-t_n} = \sum_{i=1}^n \frac{Cp_i + Cp_{i+1}}{2} \times \Delta t$$

Em que Cp é a concentração plasmática e t é o tempo.

Para $ASC_{0-\infty}$ foi aplicada a equação 2.

Equação 2
$$ASC_{0-\infty} = ASC_{0-tn} + \left(\frac{Cp_n}{k_{el}} \right)$$

Em que Cp_n é a última concentração da curva de concentração plasmática versus tempo e β é a inclinação da reta de regressão linear do logaritmo das concentrações plasmáticas pelo tempo, na fase de eliminação.

A constante β foi utilizada para calcular a meia vida do processo a que pertence (eliminação), seguindo a equação 3

Equação 3
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\beta}$$

No grupo que recebeu o fármaco pela via intravenosa o Clearance (Cl) foi calculado pela equação 4

Equação 4
$$Cl = \frac{DOSE}{ASC_{0-\infty}}$$

No grupo que recebeu o fármaco pela via intravenosa o volume de distribuição ($Vd_{\text{área}}$) foi calculado pela equação 5.

Equação 5
$$Vd_{\text{área}} = \frac{Cl}{\beta}$$

A relação entre ASC0-t e ASC0-inf foi utilizada para verificar se o tempo de coleta foi suficiente para a determinação confiável dos parâmetros farmacocinéticos. É desejável que esta relação seja no mínimo 0,8.

Equação 6
$$Rarea = \frac{ASC0-t}{ASC0-inf}$$

4.9 .Análises *in silico*

4.9.1 – Desenvolvimento do modelo farmacocinético base

Um modelo farmacocinético foi desenvolvido e validado utilizando modelagem de Modelos Mistos Não-Lineares (NLME) através da aplicação do software Phoenix NLME 1.3 (Certara Pharsight, Cary, NC). O algoritmo do método de estimativa utilizado varia de acordo com os dados obtidos após as análises das coletas nos animais. Assim como o algoritmo do método de estimativa, todos os parâmetros do modelo farmacocinético foram explorados em conformidade com a adequação aos dados obtidos experimentalmente para a confecção do modelo base. O modelo base foi escolhido de acordo com a melhora no valor de função objetiva (OFV), calculado pelo Phoenix NLME 1.3 como $2^* - (\log \text{ de probabilidade})$, o qual é alterado de acordo com a mudança dos algoritmo de estimativa e equações diferenciais a serem escolhidos. A fórmula geral para este cálculo está apresentada na equação 7.

Equação 7

$$OF_{ML}(x_j, \theta, \sigma^2) = \sum_{j=1}^n \left[\frac{(y_j - f(x_j, \theta))^2}{\sigma^2} + \ln \sigma^2 \right]$$

Em que y_j são os dados observados em tempo j , x_j são os dados preditos no tempo j Θ são os parâmetros do modelo, σ^2 representa a variância (BONATE, 2011).

4.9.2 Modelos de covariáveis

A identificação de potenciais efeitos de covariáveis nos parâmetros farmacocinéticos foram realizados por relações visuais e estatísticas entre a estimativa de eta post hoc individual (η) de cada parâmetro e os valores das covariáveis. Para se avaliar a covariância entre parâmetros foi utilizada uma matriz em bloco de variância-covariância Ω (matriz Ω ou block Ω matrix). Inicialmente, as covariáveis foram incluídas de uma a uma (univariate) baseada em reduções significantes no valor de função objetiva (OFV) para o determinado parâmetro ($p < 0.05$), etapa chamada então de univariate stepwise forward-inclusion. Covariáveis que apresentaram melhora significativa do modelo farmacocinético da forma acima descrita foram adicionadas umas a outras em forma de multivariáveis (multivariate). Assim que o modelo completo for atingido, uma eliminação de covariáveis da forma contrária, stepwise backward elimination, foi realizada ($p < 0.01$) para identificar o modelo final.

4.9.3 Avaliação do Modelo Final

Foram utilizados 22 animais na análise farmacocinética populacional, sendo divididos em dois grupos de 11 animais sendo somados 6 animais aos 5 animais por grupo anteriormente utilizados para a farmacocinética individual.

Os modelos foram comparados segundo o valor de função objetiva, no caso de modelos aninhados, e em modelos não aninhados o critério informativo de Akaike (AIC) foi utilizado para essa comparação.

O modelo final foi visualmente inspecionado quanto à qualidade no ajuste de concentrações observadas (variável dependente ou DV), predição populacional (PRED), predição individual (IPRED) e resíduos condicionalmente ponderados (CWRES) vs tempo. Gráficos de quantil-quantil (QQ plots) para cada parâmetro η foram checados quanto à pressuposição de sua distribuição normal. Além disso, o η -shrinkage ou redução de η para cada parâmetro foi também investigado.

A capacidade do modelo final de prever a concentração será testada por VPC's (Visual Predictive Checks) utilizando o Phoenix NLME, com gráficos que serão gerados por linguagem de programação estatística "R" v3.1.3. Ainda, intervalos de confiança não-paramétricos foram obtidos através de reamostragem por bootstrap, utilizando o Phoenix NLME 1.3, reamostrando quantas amostras forem necessárias para um nível de segurança otimizado do modelo.

4.10 Análise de parâmetros bioquímicos renais

4.10.1 Creatinina

As alterações da função renal são os principais efeitos tóxicos observados na administração da anfotericina, que podem ser eventualmente avaliadas através da determinação dos níveis séricos de creatinina.

A definição de lesão renal aguda envolve um forte decréscimo da taxa de filtração glomerular – que pode ocorrer por minutos ou dias – com retenção de uréia nitrogenada sanguínea e creatinina sérica. A creatinina, em especial, tem papel de grande importância no diagnóstico precoce de lesões renais agudas, uma vez que até mesmo discretos aumentos de sua concentração plasmática estão relacionados ao surgimento de insuficiência renal aguda, por exemplo. É importante ressaltar que não é possível observar grandes aumentos nos níveis de creatinina até um ou dois dias após o início da lesão renal, no entanto, quando esse aumento aparece de maneira exacerbada, a lesão renal aguda é caracterizada (NEGI E SHIGEMATSU, 2012).

Essa avaliação foi realizada em amostras de plasma por reação de ponto final utilizando Kit Labtest® (Ref. 35).

O método utilizado baseia-se na observação de que a reação da creatinina com o picrato alcalino é muito rápida, enquanto a reação do picrato com os cromogênios é mais lenta. A medida da reação nos primeiros minutos permite a determinação da creatinina. A creatinina e outros componentes do soro reagem com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelha que será medido fotometricamente.

Creatinina + Ácido Pícrico → Picrato de Creatinina

As coletas de plasma para a determinação de creatinina foram realizadas imediatamente antes da administração e no tempo 48h após a administração das formulações.

4.10.2 Ureia

O acúmulo de ureia também é uma característica notável durante a ocorrência de lesões renais agudas (RICCI; RONCO, 2012). A ureia se caracteriza por ser o metabólito nitrogenado majoritariamente produzido pela degradação de proteínas no organismo, sendo que 90% de sua excreção ocorre pelos rins. Entre os fatores que alteram a concentração de ureia sem terem qualquer relação com o sistema renal, pode-se citar a taxa de produção hepática e a dieta, no entanto, esse composto apresenta significado clínico relevante para diagnóstico de lesões renais quando determinado em conjunto com a creatinina plasmática. Resultados anormais dessa análise podem ser reflexos de diferentes problemas renais como, por exemplo, necrose tubular aguda, diminuição do fluxo sanguíneo renal, processos obstrutivos pós-renais e ainda estenose de vias urinárias (SODRÉ *et al.*, 2007).

A determinação da ureia em amostras de sangue através de reação de ponto final é útil na avaliação da função renal. Esse parâmetro bioquímico foi determinado utilizando-se Kit Labtest® (Ref. 104). O princípio da técnica para determinação de ureia é descrito a seguir: A ureia é hidrolisada pela urease, gerando amônia e dióxido de carbono.



A amônia reage com o 2 cetoglutarato e NADH em uma reação catalisada pela glutamato desidrogenase (GLDH), ocorrendo oxidação da NADH a NAD. A consequente redução da absorbância, medida em 340 ou 365 nm, é proporcional à concentração de ureia na amostra (Kit Labtest Ref. 104).



As coletas de plasma para a determinação de creatinina foram realizadas imediatamente antes da administração e no tempo 48h após a administração das formulações

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva analítica para a determinação da concentração de AmB na microemulsão

Foi construída uma curva analítica utilizando-se soluções de AmB como amostras e controles de qualidade. A tabela 2 apresenta os valores obtidos de linearidade.

Tabela 2 - Médias das concentrações utilizadas para construção da curva de calibração analítica. Estão expressas precisão através do desvio padrão relativo (DPR) e exatidão da curva. (n=5)

Anfotericina B						
Nominal (µg/mL)	0,5	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0
Calculado (µg/mL)	0,59	1,13	2,64	5,37	8,14	9,74
DPR (%)	0,60	1,09	0,83	1,16	1,01	1,36
Exatidão (%)	119,8	113,9	105,8	107,5	108,6	97,41
	3	9	8	1	2	

O método de regressão dos mínimos quadrados foi utilizado para verificar a linearidade da curva, o coeficiente de correlação (r^2) foi de 0,9966, acima do valor desejável de 0,98, e exatidão flutuou entre 97-114%, obedecendo a faixa de 85 – 115, exceto para o LIQ (50 ng/mL) que deve apresentar exatidão entre 80-120%, demonstrando assim que a curva analítica está de acordo com os critérios de aceitação de precisão e exatidão da ANVISA e FDA. A curva de calibração e sua respectiva equação da reta obtida estão representadas na figura 10.

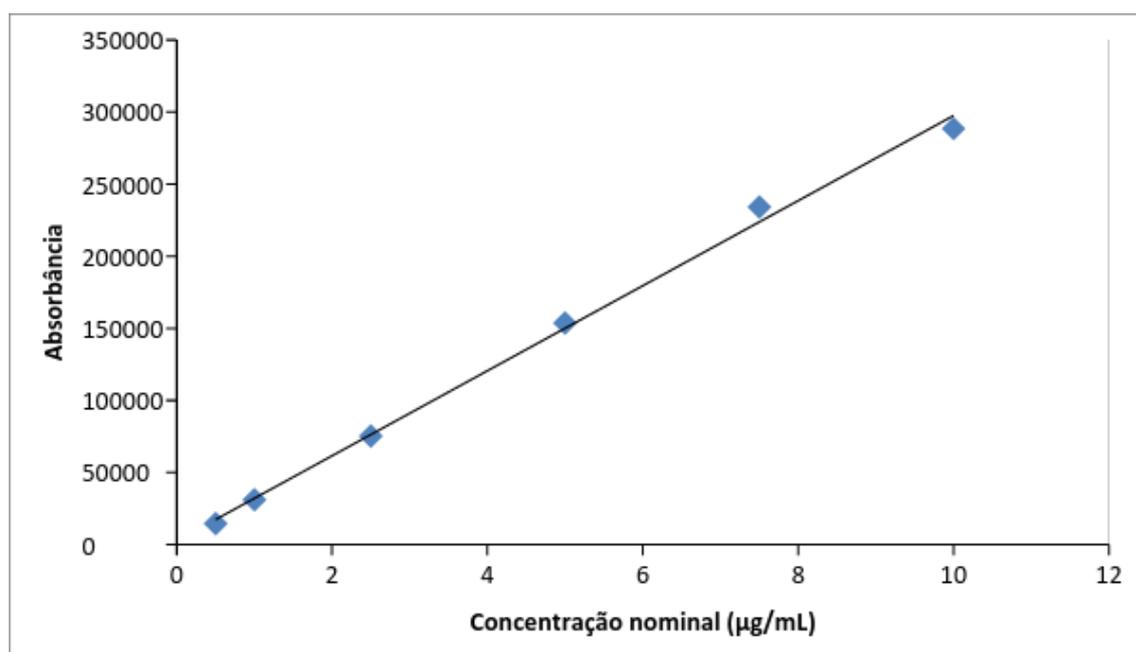


Figura 10 - curva analítica da AmB (n=5 replicatas)

5.2 Validação do método bioanalítico

O método bioanalítico, utilizado para quantificar a AmB nas amostras de plasma de ratos wistar foi desenvolvido e validado utilizando-se o sistema cromatográfico citado na seção materiais e métodos. O método bioanalítico foi capaz de separar adequadamente a AmB e o padrão interno (PI), nifedipino, e como ditam as agências reguladoras, não foram observados picos interferentes provenientes da matriz biológica nos tempos de retenção tanto da anfotericina B quanto do PI, como estão apresentados nas figuras 11 e 12. Ainda podemos verificar que a detecção em 407 nm utilizada foi excelente na quantificação já que esse comprimento de onda é muito seletivo e apresenta pouca interferência de componentes do plasma ou

contaminantes que possam estar presentes nos fármacos adquiridos comercialmente.

Para a validação do método bioanalítico, amostras de plasma branco de ratos wistar foram adicionadas de AmB em 6 (seis) concentrações (50 – 1000 ng/mL) em triplicata, a partir de uma solução primária de AmB em metanol de 100 µg/mL e foram preparadas conforme descrito na seção Materiais e Métodos.

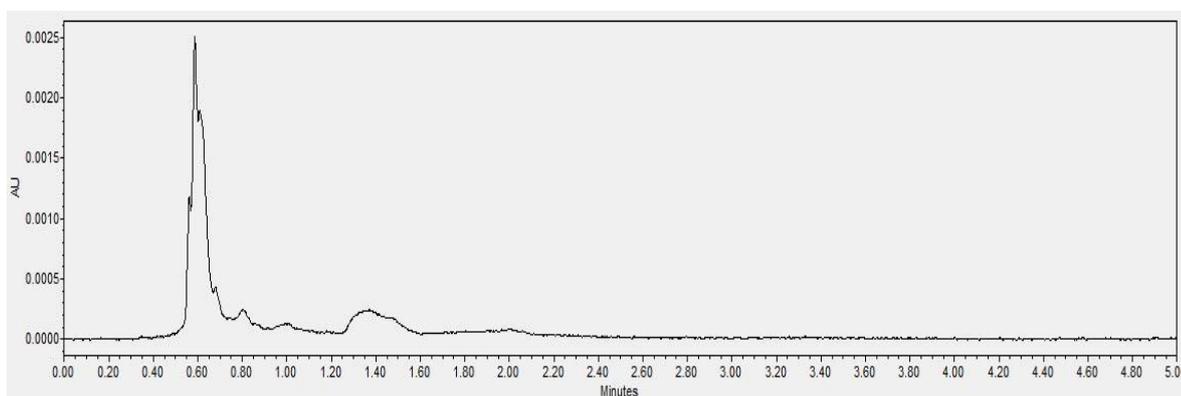


Figura 11 - Cromatograma branco do método bioanalítico da AmB

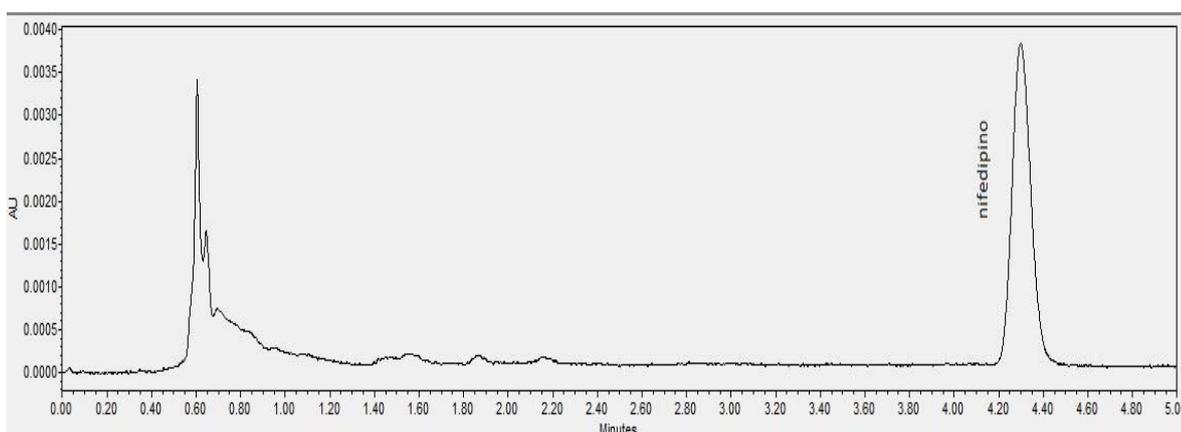


Figura 12 - Cromatograma "zero" do método bioanalítico da AmB

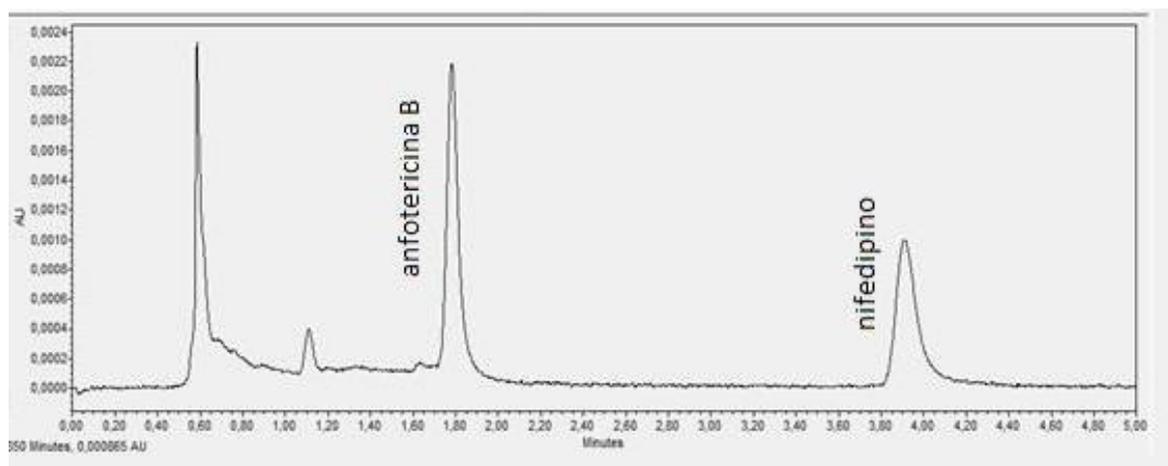


Figura 13 - Cromatograma do método bioanalítico da AmB (AmB 1ug/mL, nifedipino 20 ug/mL)

Os cromatogramas finais apresentaram um tempo de corrida muito menor dos que usualmente utilizados em cromatografia líquida para a quantificação de anfotericina B. Normalmente, os métodos para a quantificação de anfotericina apresentam um tempo de análise que varia entre 10 a 30 minutos, enquanto o método bioanalítico validado nesse estudo apresentou um tempo de corrida de apenas 5 minutos (EGGER, 2001; ESPADA, 2008; LAMBROS, 1996; PFEIFER, 2015).

As amostras foram preparadas nas concentrações conhecidas (padrão de calibração - PC) para construção da curva de calibração, já os controles de qualidade (CQ) foram preparados para os ensaios de exatidão e precisão e monitoramento do método.

4.2.1 Curva bioanalítica e linearidade

A curva analítica para quantificar AmB em plasma foi construída através da razão entre os valores das áreas de AmB e do PI contra a concentração nominal da AmB. A tabela 4 apresenta os valores da linearidade. A figura 14 representa a análise dos controles de qualidade e suas variações de seus valores nominais.

Tabela 3 - Concentração nominal, médias das concentrações experimentais que construíram a curva de calibração bioanalítica. Precisão expressa em desvio padrão relativo (DPR) e exatidão da curva (n=4)

Anfotericina B – Validação do Método Bioanalítico							
Nominal (µg/mL)	Média (µg/mL)	DP	EXATIDÃO	DPR	WRP	BRP	n
0.05	0.0537	0.0036	7.73%	6.73	6.65	1.19	20
0.1	0.1009	0.0057	1.04%	6.26	6.18	1.20	20
0.5	0.5028	0.0171	0.99%	3.80	3.33	2.06	20
0.75	0.7549	0.0249	1.54%	3.39	3.53	-	20

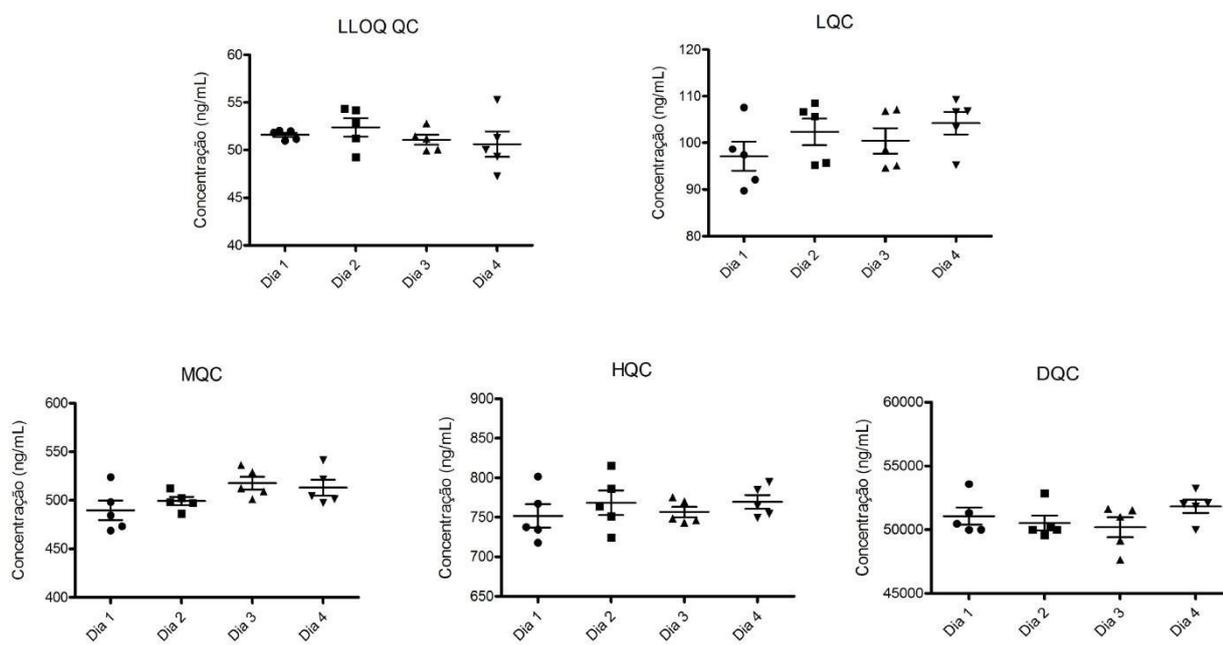


Figura 2 - Controles de qualidade utilizados na validação do método bioanalítico da AmB.

O método de regressão dos mínimos quadrados foi utilizado para verificar a linearidade da curva, o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,9996, acima de 0,98 e exatidão entre 85-115%, exceto para o LIQ (50 ng/mL) que deve apresentar exatidão entre 80-120%, demonstrando assim que a curva analítica está de acordo com os critérios de aceitação da curva de calibração/linearidade segundo a ANVISA. A figura 15 apresenta a curva de calibração juntamente com o valor de R^2 e sua equação da reta.

Assim, o método desenvolvido e validado neste trabalho foi linear na faixa de 0,05 a 1 $\mu\text{g/mL}$ para determinação de anfotericina B em plasma de ratos, com limite de detecção de 0,025 $\mu\text{g/mL}$. Al-Quadeib et al. (2014), utilizando a técnica de UHPLC com detector de massas alcançou linearidade de 0,2 a 4 $\mu\text{g/mL}$ e Qin et al. (2012) obtiveram linearidade de 0,005 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e também Deshpande et al. (2009) obteve linearidade na faixa de 0,25 a 15 $\mu\text{g/mL}$ utilizando a mesma técnica. Considerando que o MIC para *C. albicans* é de 0,125 $\mu\text{g/mL}$ o método de Al-Quadeib e Deshpande não atingem os níveis necessários para a quantificação de anfotericina nessa faixa de concentração e o método desenvolvido neste trabalho demonstra a aplicabilidade da detecção UV para atingir esses níveis.

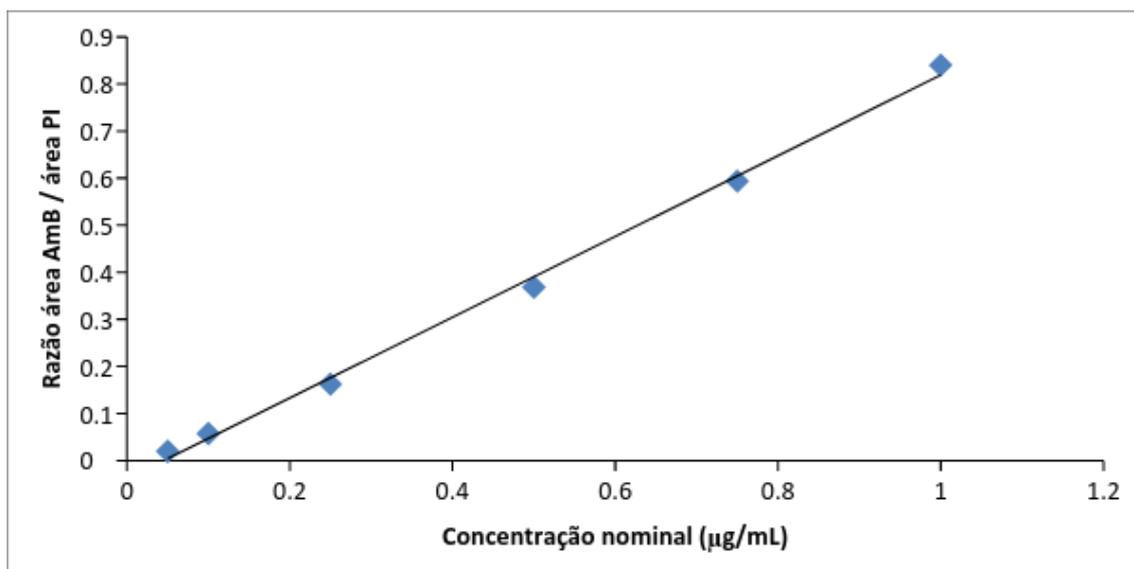


Figura 15 - curva do método bioanalítico da AmB.

4.2.2 Estabilidade

O estudo de estabilidade é necessário para que se tenha conhecimento do tempo em que a amostra pode ser armazenada após a coleta, sem que o processamento e a análise das amostras sejam prejudicados por degradações do analito. Desta forma, o estudo de estabilidade é imprescindível para que se garanta a efetividade do armazenamento, evitando degradação do analito, e posterior confiabilidade nos resultados após a leitura pelo sistema cromatográfico. Os resultados do estudo de estabilidade estão apresentados na tabela 5.

Tabela 4 - Estudo de estabilidade da AmB (n=5)

CQs	ESTATÍSTICAS	CD 6h	PP (10°C)	CCD (-20°C) 3 ciclos	LD (-20°C) 70 dias
	n	5	5	5	5
CQB	DPR (%)	9,86	9,48	4,45	12,74
	Exatidão (%)	4,43	4,45	16,46	9,42
	n	5	5	5	5
CQA	DPR (%)	9,88	12,65	4,36	8,44
	Exatidão (%)	5,9	3,24	11,69	7,46

DPR - desvio padrão relativo, CQA - controle de qualidade alto, CQB - controle de qualidade baixo, CD - curta duração em temperatura da sala de processamento, PP - pós processamento, CCD - ciclo de congelamento e descongelamento, LD - longa duração.

Os resultados dos estudos de estabilidade demonstraram que é possível o armazenamento de amostras por 70 dias a -20 ° C, a manutenção da amostra processada a 10 ° C por 24h, e a viabilidade das amostras no período de 6h em temperatura ambiente. Deshpande *et al.*, observou estabilidade por 48h entre 2 e 8C, por 30 dias a -70 ° C e ainda, observou que a forma livre no plasma foi estável por três ciclos de congelamento e descongelamento a -70C enquanto a forma lipossomal em plasma foi estável em apenas um ciclo. Neste trabalho observamos instabilidade no ciclo de congelamento no ciclo de congelamento e descongelamento para a forma livre para CQB, porém as condições de armazenamento foram em temperaturas mais elevadas (-20 ° C)

5.2.3 Efeito matriz

O estudo do efeito matriz é realizado para que garanta que o analito e o padrão interno não sofrem quaisquer interferências do estado da amostra de

plasma. O estudo do efeito matriz é realizado utilizando-se amostras de plasma lipêmicas e hemolisadas mimetizando uma situação que pudesse vir a ocorrer nas coletas durante o experimento de farmacocinética. A tabela 6 mostra os resultados do estudo de efeito matriz.

Tabela 5 - Estudo de efeito matriz (n=5)

FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO POR PI		
CONC. (ng/mL)	100	750
Média	0,59	6,89
DPR (%)	1,67	1,00
CV (%)	2,83	0,14

Nas condições analíticas estabelecidas não houve interferência de leitura tanto no fármaco quanto do padrão interno.

5.2.4 Efeito residual

O estudo de defeito residual expressa a alteração de sinal ou aparecimento de picos interferentes nos tempos de retenção do analito e do PI por contaminação ou retenção dos mesmos na coluna de separação ou em outra seção do sistema cromatográfico. O efeito residual é determinado através da injeção de amostras brancas antes e após a injeção de uma amostra na concentração mais elevada da curva, 1000 ng/mL no caso do método validado nesse estudo. A figura 16 mostra o efeito residual.

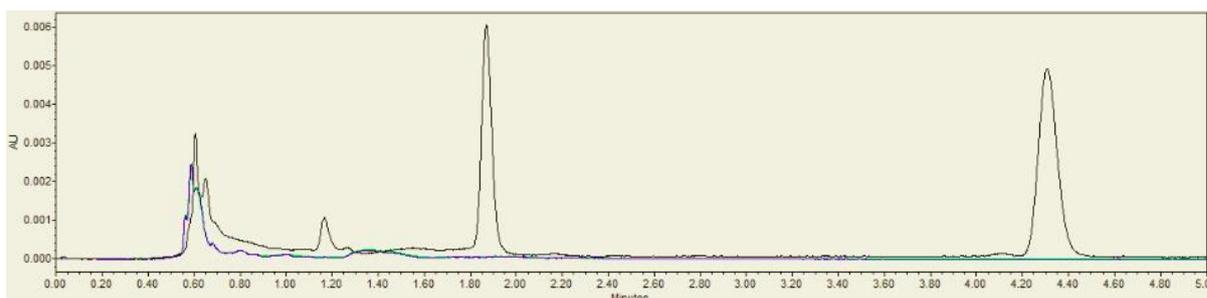


Figura 16 - Estudo de efeito residual da AmB.

- . ___ AmB 1000 ng/mL + PI
- ___ branco após corrida AmB 1000 ng/mL I
- ___ branco após corrida AmB 1000 ng/mL II

É possível observar que a injeção de amostras da maior concentração não interferem em leituras subsequentes.

Os resultados de validação demonstraram limites de confiança para o método bioanalítico desenvolvido adequados à sua aplicação no estudo de farmacocinética, sendo que esse método apresenta um menor consumo de solventes devido a seu menor tempo de análise e também um menor tempo para o processamento das amostras.

5.3 Análise farmacocinética

Todos os produtos farmacêuticos passam primeiramente por testes *in vitro* para que suas características sejam extensivamente conhecidas. No caso de novas formulações, como a microemulsão de anfotericina B, é necessária a sua caracterização previamente aos estudos pré-clínicos, atestando a segurança e compatibilidade com meios biológicos já realizada por Franzini (2010).

No presente estudo realizou-se a primeira administração da microemulsão em modelo animal e, embora a formulação tenha sido planejada para uso oral, utilizamos a administração intravenosa como referência para cálculo posterior da biodisponibilidade oral. Ainda, a administração pela via intravenosa da nova microemulsão permitiu comparações tanto da farmacocinética quanto das manifestações agudas durante a infusão lenta com a formulação comercial (desoxicolato).

A disposição cinética da AmB foi avaliada após administração intravenosa do produto comercial Anforicin[®] e administração intravenosa da formulação proposta de AmB-ME.

Na figura 17 pode-se observar a curva média de concentração plasmática *versus* tempo construída após a administração intravenosa de Anforicin[®] (1 mg/kg) e AmB-ME (1 mg/kg) e desvio padrão.

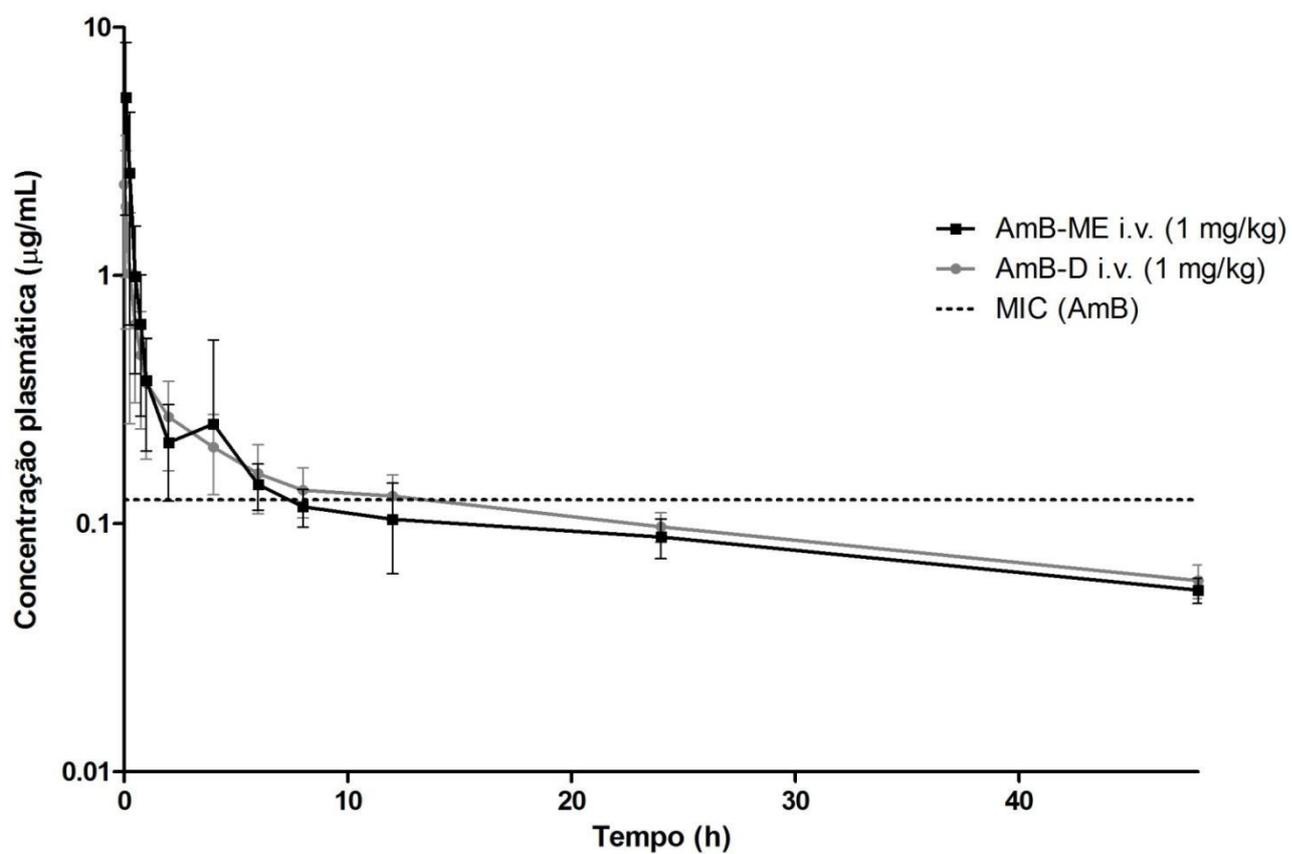


Figura 3 - Perfis Farmacocinéticos médios obtidos após a administração de Anforicin® e MEAmB (n=5, 1mg/kg).

Para a análise farmacocinética de ambas as administrações foram empregados os cálculos do modelo bicompartimental, já que através da inspeção visual das curvas de decaimento e confirmação das constantes de eliminação, é notória a segmentação das curvas em duas velocidades de decaimento distintas. No caso dos perfis farmacocinéticos da anfotericina B, apresentados em ambas as administrações intravenosas, a primeira velocidade de decaimento representa uma fase mista formada por eliminação e, majoritariamente, distribuição. A segunda fase ocorre após a saturação dos tecidos decorrente da ocorrência de equilíbrio na distribuição, a partir da qual a eliminação é o processo majoritário na determinação da concentração plasmática. Com base nos resultados obtidos a partir das administrações intravenosas foi possível calcular os parâmetros farmacocinéticos tanto para o Anforicin® quanto para a AmB-ME que estão apresentados na tabela 7.

Tabela 6 - Parâmetros farmacocinéticos das administrações intravenosas de anfotericina B comercial (Anforicin®) e da microemulsão de anfotericina B (AmB-ME).

Parâmetros Farmacocinéticos	Anforicin (i.v.)	AmB Microemulsão (i.v.)
auc 0-inf (ug/mL.min)	425,43 480,28 (388,43-572,12)	538,19 546,95 (498,46-595,43)
β (min ⁻¹)	0,0004 0,00037 (0,00030 – 0,00045)	0,0003 0,00031 (0,00027 – 0,00035)
t1/2 β (min)	1732,5 1944,22 (1508,50 – 2379,94)	2069,11 2293,87 (1954,41 – 2633,32)
Cl (mL/min.kg)	1,72 1,87 (1,63 – 2,11)	1,85 1,83 (1,68 – 1,98)
Vd (mL/kg)	5683,23 5296,45 (3906,38 – 6686,52)	5969,28 5988,17 (5517,25 – 6459,08)
MRT (min)	2212,35 2446,20 (1815,96 – 3046,45)	2271,02 1980,85 (1183,89 – 2778,14)
α (min ⁻¹)	0,053 0,0504 (0,039 – 0,061)	0,052 0,050 (0,042 – 0,058)
t1/2 α (min)	13,07 14,77 (11,24 – 18,31)	13,32 14,31 (12,02 – 16,61)

Parâmetros expressos em mediana, média (IC95). AUC 0-inf – área sob a curva do tempo zero extrapolado ao infinito, β – constante de eliminação, t1/2 β – meia-vida de eliminação, Cl – clearance, Vd – volume de distribuição, MRT – tempo de residência médio, α – constante de distribuição, t1/2 α – meia-vida de distribuição, * - diferença estatística significativa ($p < 0,05$) comparados por Mann-Whitney, n=5 por grupo.

As administrações intravenosas tanto de Anforicin® quanto AmB-ME não apresentaram diferenças significativas em nenhum parâmetro farmacocinético. Em geral há expectativa de que a administração intravenosa, mesmo de diferentes formulações, não resulte em diferenças no perfil farmacocinético uma vez que as formulações tendem modificar essencialmente as fases de absorção e distribuição de fármacos, e na administração intravenosa, a fase majoritária observada é a eliminação, embora neste caso o processo de distribuição seja notável.

Após a administração de 1mg/kg as concentrações quantificadas no plasma estiveram acima do limite de quantificação do método até 48h pós-dose, conforme verificado nos estudos piloto realizados previamente. A anfotericina B apresentou uma eliminação bifásica com meia vida de 28,8 e 34,4h (1732,5 e 2069,1 min) para AmB-D e MEAmB respectivamente. Os parâmetros de distribuição como V_d e α não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos demonstrando que apesar da MEAmB ser uma formulação que possui uma matriz muito mais complexa comparada à AmB-D, esse fato não interfere no tempo necessário para a distribuição do fármaco para os diferentes tecidos ($\alpha = 13,07$ vs $13,32$ minutos para AmB-D e MEAmB) ou na extensão dessa distribuição para diferentes tecidos ($V_d = 5683,23$ vs $5969,28$ ml/kg) para AmB-D e MEAmB respectivamente).

A similaridade nos perfis farmacocinéticos da nova formulação e o produto comercial, já muito bem estabelecido na terapêutica, reforça que a AmB-ME se utilizada intravenosamente mantém as características do Anforicin®, facilitando o seu emprego na clínica.

A extensa distribuição para esse modelo animal indica um acúmulo extravascular do fármaco e é compatível com estudos em ratos. Ainda, os parâmetros de eliminação, Cl ($1,72$ vs $1,85$ ml/min*kg para AmB-D e MEAmB e β

(0,0004 vs 0,0003 min⁻¹) não apresentaram diferenças estatísticas indicando que a microemulsão não afetou o processo de eliminação da AmB. Adicionalmente, o tempo de residência médio (MRT) também não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos, demonstrando que apesar da AmB necessitar dos processos de liberação de fármaco do sistema microemulsionado, o mesmo não alterou seu perfil já bem conhecido e estudado. Fielding e colaboradores (1991) encontraram valores próximos aos parâmetros deste estudo para o mesmo modelo animal.

O uso da anfotericina B é também limitado devido às severas reações agudas que os pacientes comumente apresentam durante sua administração.

A administração nos animais seguiu o mesmo padrão de resposta, sendo que durante a administração intravenosa da AmB desoxicolato os animais apresentavam manifestação física de desconforto muito intensas, apesar da infusão lenta do produto. Ainda, após a administração, alguns animais permaneciam sem nenhuma mobilidade e com taxa respiratória visivelmente diminuída, em alguns casos a administração dos fármacos foi letal aos animais. Entretanto, a maioria dos animais, no período de 20 minutos retomavam o padrão de movimento e respiração. Essa reação respiratória aguda pode ser explicada pelo grande percentual de acúmulo do fármaco nos pulmões. A formulação comercial de desoxicolato tem um acúmulo médio de 30% da dose no tecido pulmonar nos primeiros 30 minutos após a administração, enquanto formulações lipídicas de anfotericina B diminuem esse acúmulo drasticamente (FIELDING, 1991).

Diferentemente do produto comercial, os animais que receberam a anfotericina B através do sistema microemulsionado não apresentaram reações agudas durante a administração, se mantendo com o padrão de comportamento de mobilidade física e frequência respiratória inalterados.

A comparação dos parâmetros farmacocinéticos globais de diferentes formulações administradas na mesma dose e pela mesma via pode não evidenciar diferenças de exposição que ocorre a cada tempo, tornando a comparação “ponto a ponto” importante para visualizar estas diferenças.

Dessa forma, para assegurar a comparação entre as duas administrações intravenosas, foi realizada uma comparação estatística “ponto a ponto” das concentrações plasmáticas encontradas em ambos os grupos. Os resultados dessa comparação estatística se encontram apresentados na tabela 8.

Tabela 7 - Comparação estatística “ponto a ponto” das concentrações plasmáticas obtidas nas administrações intravenosas de Anforicin® e AmB-ME apresentado em médias (IC95).

	AmB - ME	Anforicin®	
tempo (min)	Concentração média (µg/mL)	Concentração média (µg/mL)	p
5	5,22 (2,98 – 7,46)	2,42 (1,51 -3,34)	0,0693
15	2,59 (1,32 – 3,86)	1,32 (0,68 – 1,96)	0,1415
30	0,99 (0,61 – 1,37)	0,7 (0,33 – 1,06)	0,3324
45	0,63 (0,40 – 0,87)	0,51 (0,23 – 0,78)	0,6566
60	0,37 (0,26 – 0,49)	0,4 (0,20 – 0,61)	0,8125
120	0,21 (0,155 – 0,27)	0,26 (0,13 – 0,39)	0,488
240	0,25 (0,06 – 0,44)	0,19 (0,11 – 0,27)	0,6215
360	0,14 (0,12 – 0,16)	0,15 (0,09 – 0,22)	0,7374
480	0,11 (0,10 – 0,13)	0,12 (0,07 – 0,17)	0,6931
720	0,10 (0,07 – 0,13)	0,11 (0,07 – 0,16)	0,6537
1440	0,08 (0,08 – 0,09)	0,08 (0,06 – 0,11)	0,9377
2880	0,05 (0,050 – 0,057)	0,06 (0,065 – 0,066)	0,0171*

Através das comparações estatísticas realizadas fica evidente que a microemulsão apresenta o mesmo comportamento cinético do Anforicin® quando administrado intravenosamente. A última concentração, no tempo de 48h apresentou diferença estatística entre os grupos, porém o número de animais que apresentou concentrações quantificáveis foi muito reduzido no grupo da formulação comercial, diminuindo-se então o poder de comparação entre os grupos.

O foco no desenvolvimento da nova formulação microemulsionada é o aumento de sua biodisponibilidade oral, visto que a mesma na apresentação comercial Anforicin® é de apenas 5% (NASSAR, 2009). O perfil de concentração plasmática vs tempo obtido após a administração via gavagem do sistema microemulsionado está apresentado na figura 18.

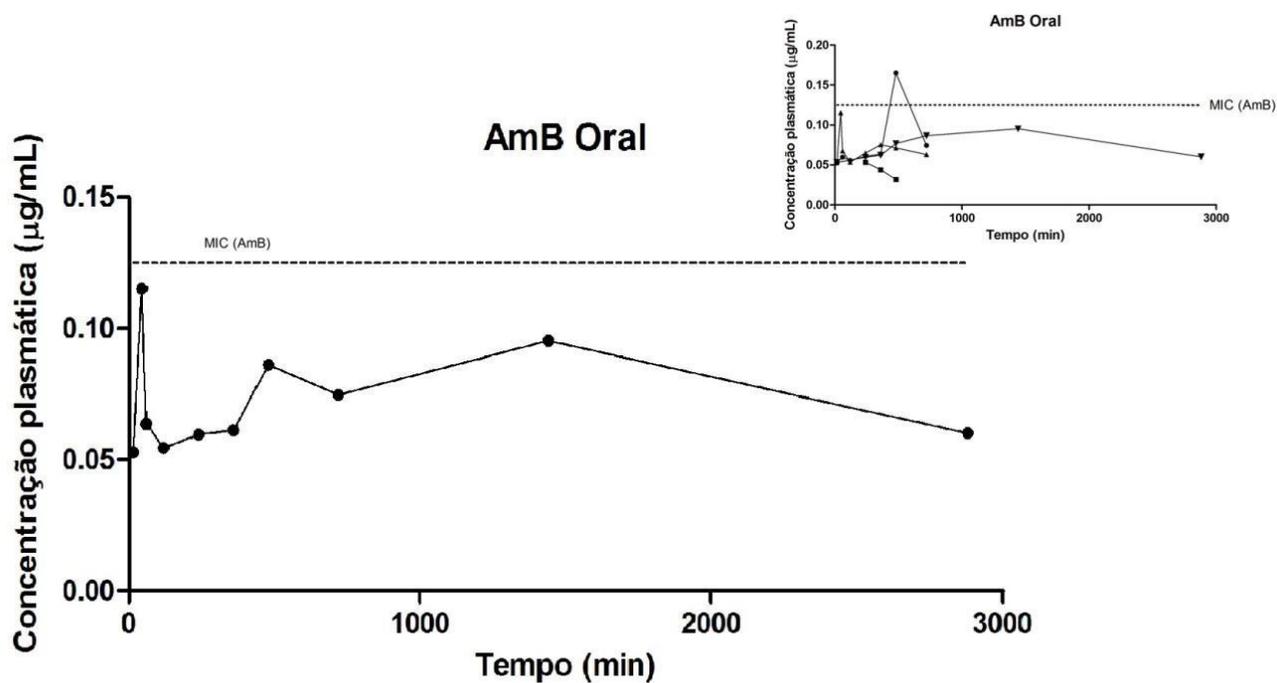


Figura 4 - Perfil farmacocinético médio (abaixo) e individuais (detalhe) após administração oral de MEAmB (n=5, 10mg/kg).

A administração oral do sistema microemulsionado apresentou perfis de concentração plasmática vs tempo irregulares e, apesar de administrado uma dose 10 vezes maior pela via oral, a anfotericina B apresentou concentrações muito baixas, denotando uma baixa taxa de absorção. Além da baixa absorção apresentada nos animais, em um dos 5 que recebeu a formulação, não apresentou nenhuma concentração de anfotericina B quantificável pelo método bioanalítico validado nesse estudo.

A absorção errática determinada pela MEAmB pode ser explicada devido à natureza cristalina da molécula de colesterol, que sem nenhum agente amorfizante na formulação confere uma liberação errática do fármaco no organismo e a consequente absorção com as mesmas características.

Os perfis farmacocinéticos apresentados pela administração oral não permitiram o cálculo das velocidades de decaimento (α e β) e dos parâmetros farmacocinéticos para essa via. Foi possível apenas calcular a biodisponibilidade oral (F) da anfotericina B, comparando-se a área sob a curva da administração oral com a intravenosa, corrigindo o resultado pela dose administrada. A biodisponibilidade oral da AmB na formulação microemulsionada foi de 5.63% demonstrando que a formulação não atingiu seu objetivo quanto ao aumento da biodisponibilidade oral quando comparado aos dados da literatura, de aproximadamente 5%. Além disso, em apenas um momento de um dos animais atingiu a concentração inibitória mínima para *C. albicans*.

5.4 – Investigação dos parâmetros bioquímicos renais

5.4.1 Determinação de Ureia

A ureia é o principal produto metabólico nitrogenado resultante do catabolismo proteico e sua excreção - mais de 90% - ocorre através dos rins. Sofre filtração glomerular e cerca de 40% a 70% retornam a circulação sanguínea pelo processo de difusão passiva, o qual é dependente do fluxo urinário (BURTIS; ASHWOOD, 2005).

O aumento nos níveis de ureia plasmática, denominado de uremia, pode ser considerado um indicador preliminar de nefrotoxicidade, entretanto existem outros fatores extra renais que induzem o aumento na concentração de ureia plasmática, tais como: dieta rica em proteínas, elevado catabolismo proteico, desidratação, perfusão reduzida dos rins, dentre outros fatores. Portanto, a ureia como parâmetro isolado não pode ser considerada um marcador de função renal confiável (BURTIS e ASHWOOD, 2005).

Assim, a principal aplicabilidade clínica da dosagem dos níveis séricos de ureia esta relacionada com a determinação, em conjunto com os níveis séricos de creatinina que refletem de modo mais apropriado os aspectos de nefrotoxicidade (SODRÉ *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos através da investigação dos níveis plasmáticos de ureia não demonstraram diferenças significativas na comparação entre pré e pós exposição tanto após a administração do Anforicin® quanto da MEAmB (Figura 19).

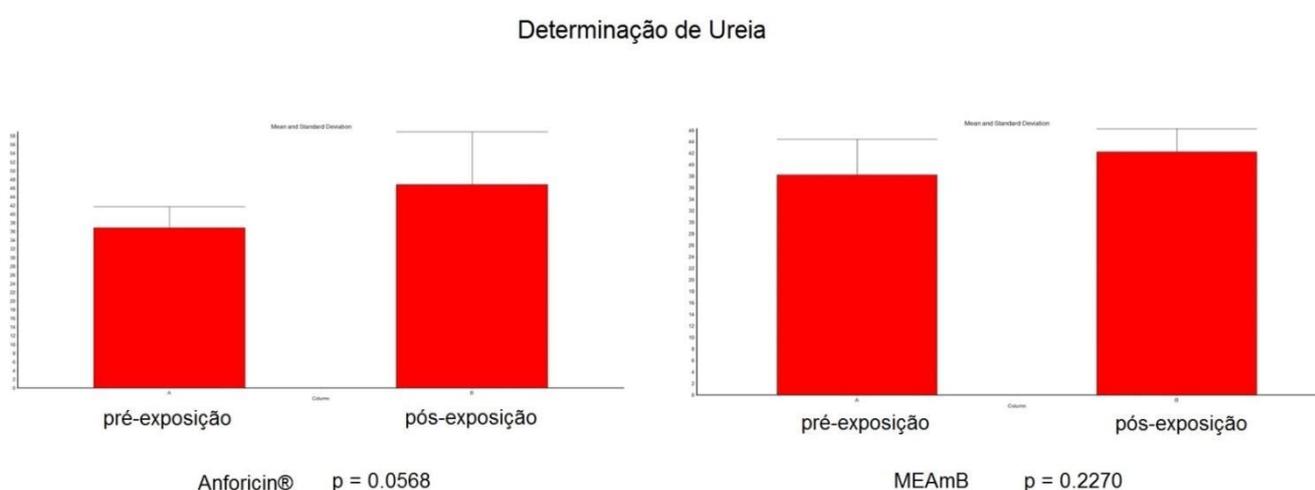


Figura 19 - Comparação estatística dos valores de ureia plasmática pré e pós exposição em dose única (n=5), teste t pareado

A comparação entre os valores de ureia pré e pós-exposição do grupo Anforicin® resultou em um valor de p no limite de significância (0.0568), não denotando nenhuma diferença estatística dentro desse grupo. O valor de p no limite de significância não nos permite concluir sobre a presença ou ausência de nefrotoxicidade do Anforicin®. Ainda que nesse estudo tenha-se utilizado o número de animais baseado na publicação de Yang e colaboradores (2005) e de Reyes-

Gordillo e colaboradores (2007) fica evidente que a utilização de um número maior de animais poderia melhorar a comparação estatística, trazendo p para um valor crítico e assim, permitindo conclusões sobre a nefrotoxicidade do Anforicin® a partir da determinação de ureia plasmática.

5.4.2 – Determinação de Creatinina

A creatinina é um produto da degradação da fosfocreatina (creatina fosforilada) presente principalmente em tecido muscular e é produzida a uma taxa relativamente constante pelo organismo, e apresenta relação direta com a taxa de massa muscular do indivíduo, ou seja, quanto maior a massa muscular, maior a taxa de creatinina (BURTIS; ASHWOOD, 2005; SODRÉ *et al.*, 2007).

É encontrada em todos os fluidos e secreções corporais e é filtrada principalmente pelos rins, embora uma pequena quantidade seja secretada na forma ativa (BURTIS; ASHWOOD, 2005).

A dosagem de creatinina plasmática é utilizada como principal indicador da função renal, porém altos níveis de creatinina no plasma são encontrados somente em estágios avançados de nefrotoxicidade, impedindo que esse indicador seja confiável para detectar dano renal em estágio inicial (BURTIS; ASHWOOD, 2005).

Os resultados obtidos demonstraram que administração única de Anforicin® alterou significativamente os níveis plasmáticos de creatinina comparando-se os valores obtidos nas amostras pré e pós-exposição, enquanto que a administração da MEAmB não determinou alterações significativas nos níveis de creatinina plasmática (Figura 20).

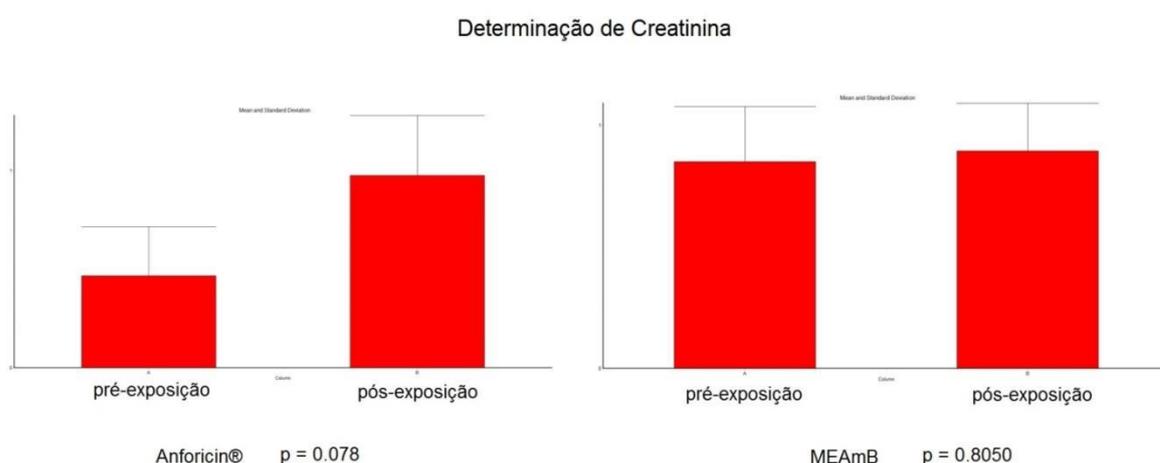


Figura 20 - Comparação estatística dos valores de creatinina plasmática pré e pós exposição em dose única (n=5) teste t pareado

Esse resultado demonstra que o Anforicin® apresenta um perfil de dano renal após sua administração, mesmo em dose única, devido a seu efeito vasoconstritor nas arteríolas renais aferentes, que resultam em diminuição do fluxo sanguíneo glomerular e tubular, como extensamente relatado na literatura (CATÁLAN; MONTEJO, 2006). Contrariamente, a MEAmB não determinou um incremento nos níveis plasmáticos de creatinina após a administração. Ainda que o

experimento tenha sido realizado com apenas uma administração intravenosa, foi possível observar que a toxicidade do Anfotericin® é capaz de elevar as concentrações médias de 0,46 (pré-exposição) a 0,97 mg/dL (pós exposição), sendo que os valores de normalidade para a creatinina em ratos seja de 0,2 – 0,8 mg/dL (HARKNESS *et al.*, 2010).

Os ratos utilizados para a administração da MEAmB apresentaram um valor de creatinina pré-exposição no limite da normalidade (0,82 mg/dL), porém a formulação não acarretou aumento significativo comparado com os resultados pós-exposição, elevando a concentração para 0,89 mg/dL, ainda no limite da normalidade para o modelo.

Em humanos existem seis principais estudos clínicos randomizados comparando a toxicidade renal de várias formulações lipídicas de anfotericina B e a formulação convencional de desoxicolato (DUPONT, 2002). White e colaboradores (1998) realizaram um estudo clínico randomizado duplo-cego de ABCD vs AmB desoxicolato. Nesse estudo, a toxicidade renal foi definida como a duplicação no valor da creatinina sérica. Em todos os pacientes avaliados, a incidência da nefrotoxicidade de ABCD foi de 40% contra 60% da formulação convencional. Ainda, existem três estudos comparativos mostrando que o AmBisome é menos nefrotóxico (WALSH, 1999; PRENTICE, 1997; LEENDERS, 1998) mesmo quando administrado em 3 mg/kg/dia contra 0,6 mg/kg/dia da AmB desoxicolato (DUPONT, 2002) . A MEAmB segue as mesmas características das formulações lipídicas supracitadas, sendo que a mesma aumentou em 10% o valor inicial da creatinina plasmática, enquanto a formulação de desoxicolato aumentou os níveis em 110,8%.

Os resultados obtidos confirmam diminuição do potencial nefrotóxico da AmB quando veiculada pela formulação microemulsionada. Esse fato corrobora com os

dados da literatura, indicando que formulações lipídicas apresentam toxicidade renal muito menos pronunciada quando comparada à formulação de AmB desoxicolato.

5.5 – Análise de Farmacocinética Populacional *in silico*

Para a análise de farmacocinética populacional foram utilizados 22 animais somando-se animais aos dados dos cinco já utilizados para o estudo de farmacocinética individual descrito anteriormente. Ao introduzir os dados no software, uma inspeção visual foi realizada nas curvas de concentração plasmática vs tempo categorizadas por formulação como indicado na figura 21.

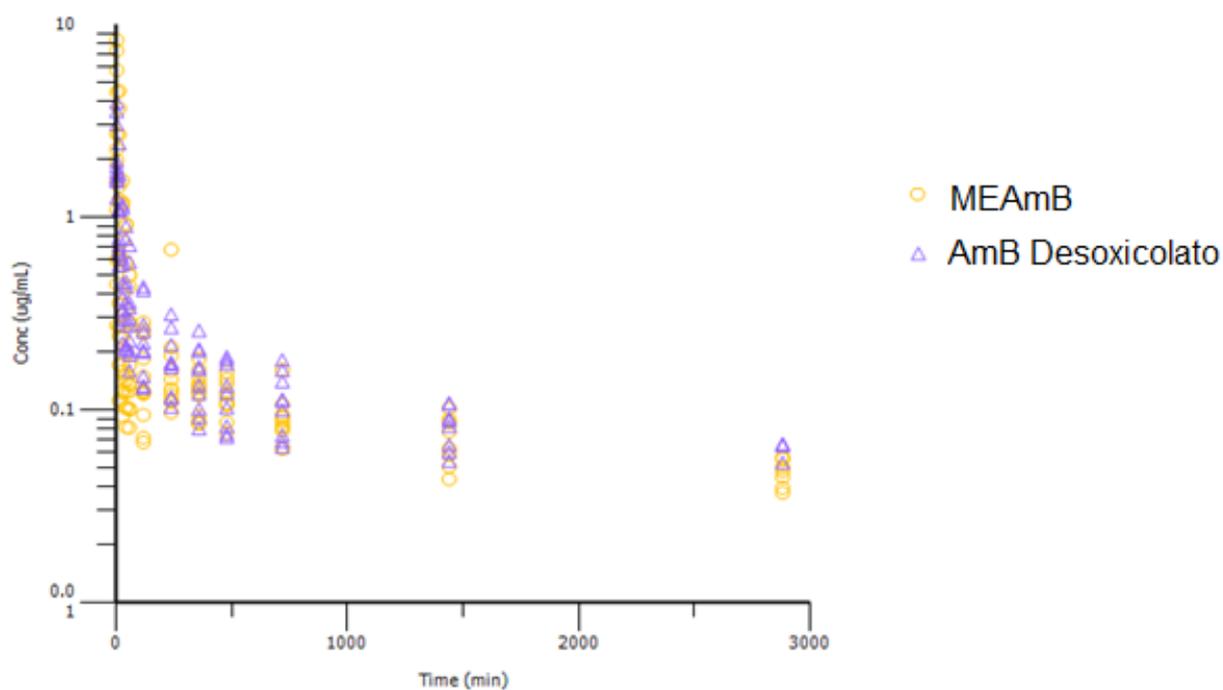


Figura 21 - Concentrações plasmáticas categorizadas por formulação

Dessa forma, foi possível observar se os diferentes grupos apresentaram tendências nos perfis de concentração de cada formulação utilizada no estudo. A partir da inspeção visual foi possível observar uma maior variação nas concentrações iniciais obtidas após a administração da AmBME por via intravenosa.

Excetuando-se os primeiros pontos, é observada uma manutenção das características observadas durante as análises de farmacocinética individual, onde as diferentes formulações não apresentaram diferenças visíveis em seus perfis farmacocinéticos.

Após essa análise foi realizada a modelização dos dados em um método de corrida do tipo *naive-pooled* onde os dados de todos os animais são tratados como um único indivíduo. Essa análise primária é realizada conjuntamente com análises não compartimentais para se obter parâmetros farmacocinéticos que serão utilizados como estimativas iniciais para a modelagem em farmacocinética populacional.

Para a realização do modelo, o algoritmo de estimativa escolhido foi o de estimativa condicional de primeira ordem dos mínimos quadrados estendidos (FOCE-ELS). Durante o desenho dos modelos, foram realizadas tentativas de modelagem dos dados da AmB em modelos de um, dois ou três compartimentos.

O modelo monocompartimental não apresentou convergência após o número máximo de iterações permitidas pelo software, demonstrando que os dados observados nas coletas não se encaixam em modelos monocompartimentais.

O segundo modelo testado foi o bicompartimental, o qual atingiu convergência e nos permitiu observar a qualidade do ajuste, ou goodness-of-fit, além dos cálculos de parâmetros farmacocinéticos populacionais, etas post-hoc individuais e parâmetros individuais para cada animal.

O modelo bicompartimental adicionado de erro residual (ϵ) aditivo ([Concentração predita + ϵ]) com a matriz de ômega não permitindo a covariância entre os parâmetros farmacocinéticos calculados para os indivíduos (matriz diagonal) – chamado em diante de M1. As figuras resultantes para esse modelo estão representadas a seguir.

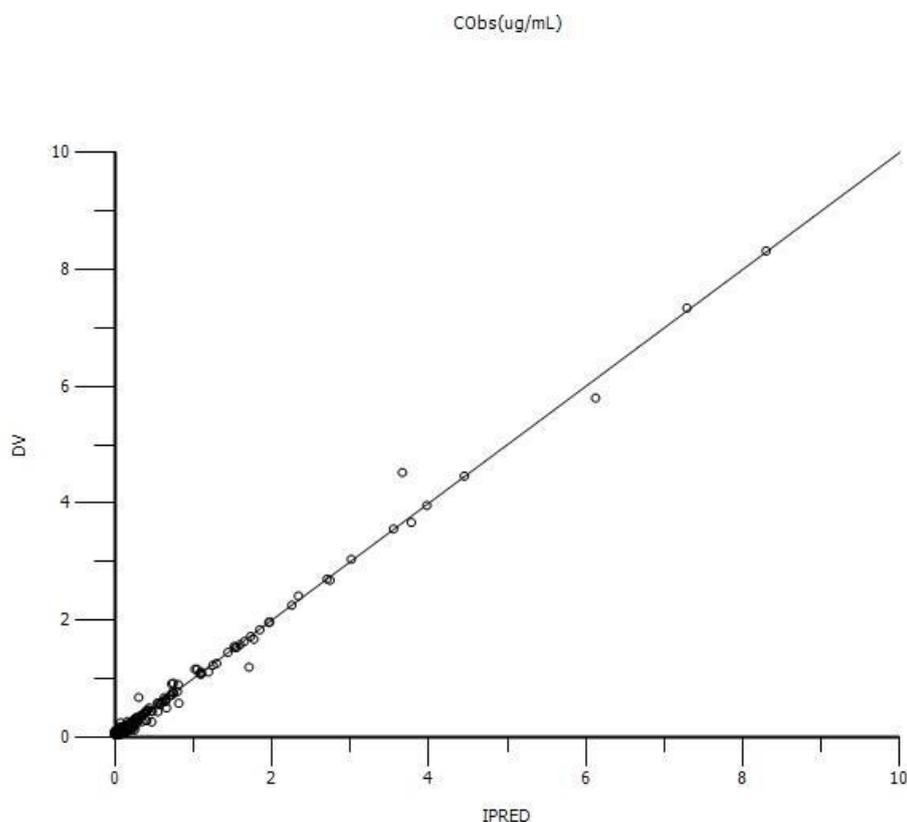


Figura 5 - Qualidade de ajuste verificada por concentrações observadas vs predições individuais de M1

M1 apresentou uma qualidade regular de ajuste verificada pelo gráfico de concentrações observadas vs predições individuais, já que apresenta-se muito concentrado no início da regressão, além e dos resíduos condicionais ponderados (CWRES) vs predições dos indivíduos.

Todavia, os dados demonstram que existe uma forte correlação entre os efeitos randômicos no modelo, especialmente entre o Cl e Vd do compartimento periférico observadas pelos gráficos de Eta-Eta apresentados na figura 23, onde eta (η) é o desvio de determinado parâmetro dos indivíduos em relação à média da população. Dessa forma, é possível saber que a matriz diagonal não é a escolha

adequada para esse modelo já que a correlação entre os parâmetros é uma parte necessária à análise.

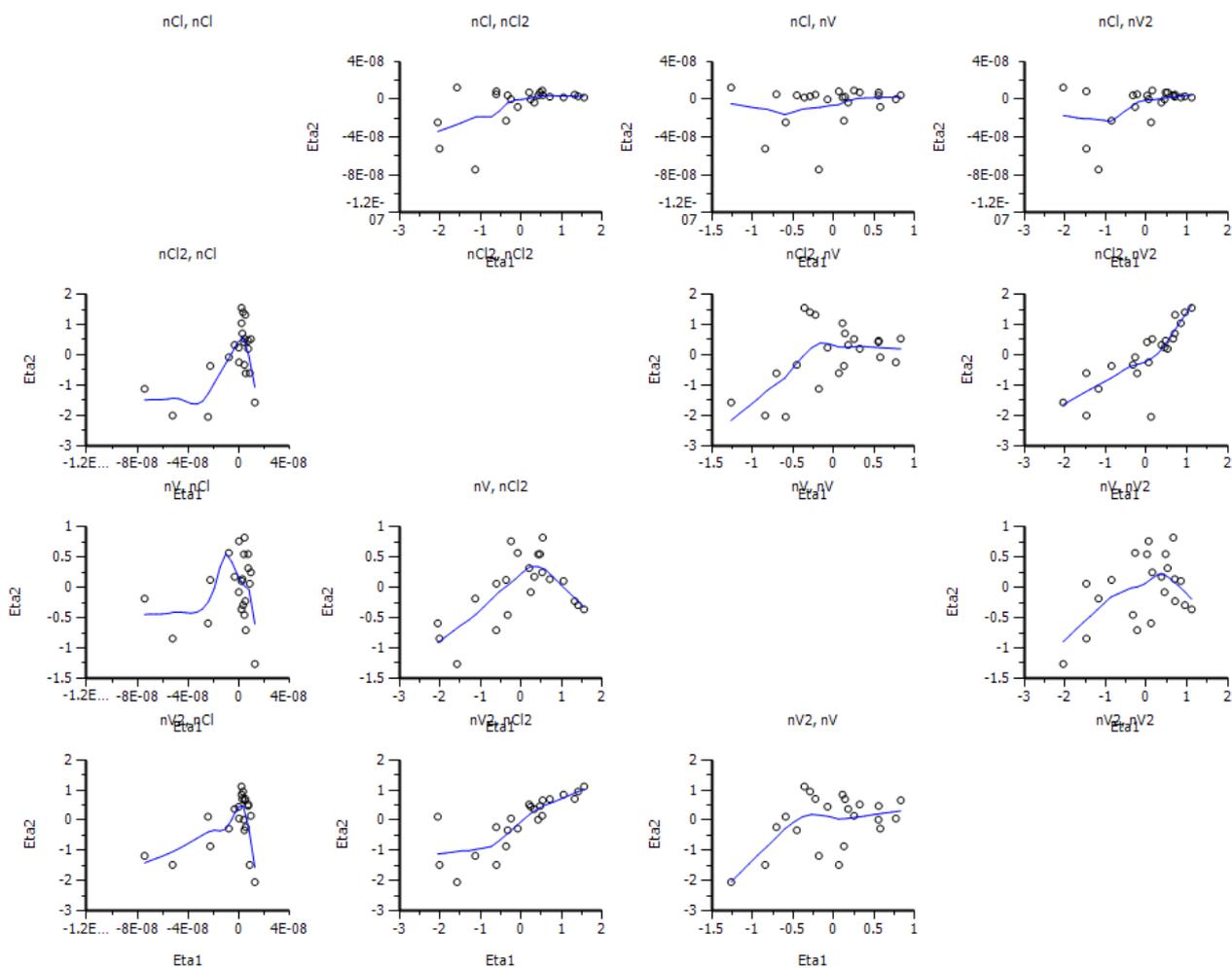


Figura 6 - Eta-Eta de M1

É possível observar ainda que o modelo aplicando o sistema de erro residual aditivo é incompatível com os dados farmacocinéticos obtidos nesse experimento. Essa situação é verdadeira na grande maioria dos casos já que o erro residual é dependente das concentrações observadas, e, ao apenas realizar a soma dos erros, fará com que as concentrações mais baixas apresentem uma tendência de não se encaixar bem no modelo desenhado, especialmente para farmacocinética (Figura 24). Sendo assim, ao se aplicar o sistema de erro residual multiplicativo ($[\text{Concentração predita}] \times [1 + \varepsilon]$), por adicionar o erro com dependência à concentração (BONATE, 2011).

Dessa forma, os parâmetros farmacocinéticos calculados por esse modelo não foram considerados e o novo sistema de erro residual e a inserção de uma matriz Ω em bloco na nova modelagem.

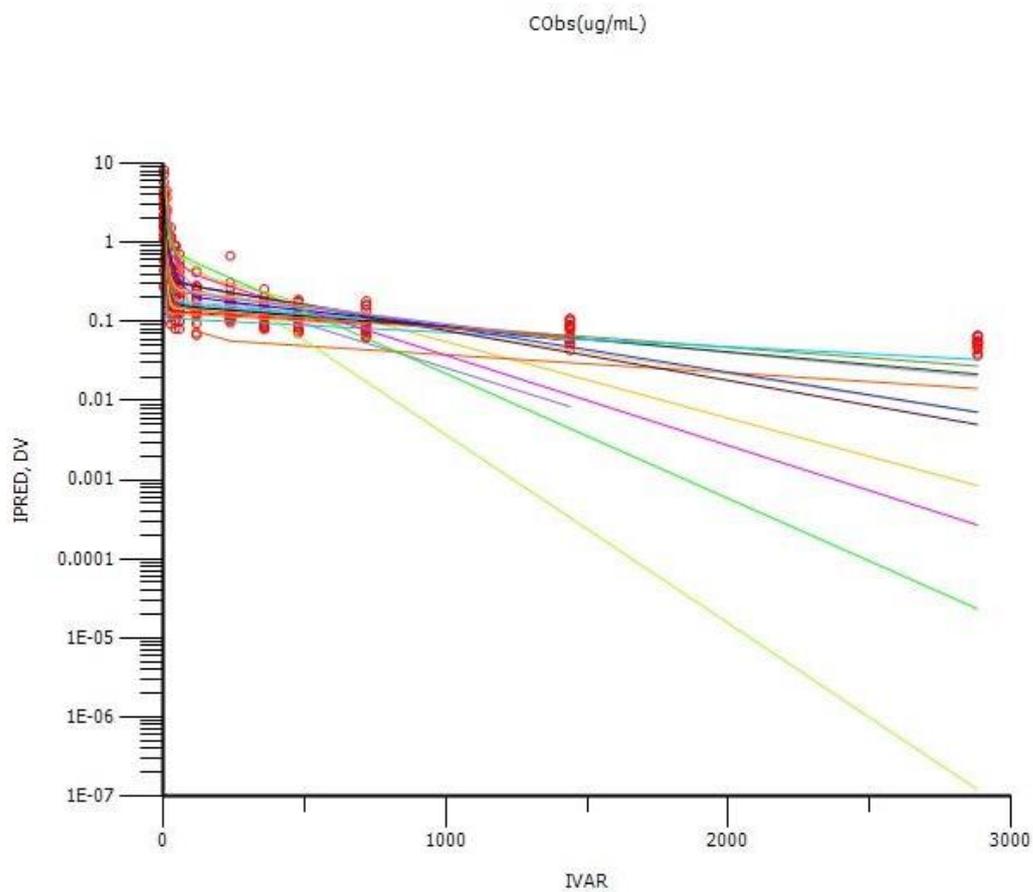


Figura 7 - Predições individuais (linhas), concentrações observadas (pontos) vs tempo para M1

O próximo modelo a ser testado foi um modelo bicompartimental com sistema de erro residual multiplicativo ($[\text{Concentração predita}] \times [1 + \epsilon]$) e uma matriz ômega em bloco – aqui referido como M2 e suas figuras de qualidade de ajuste estão representadas a seguir.

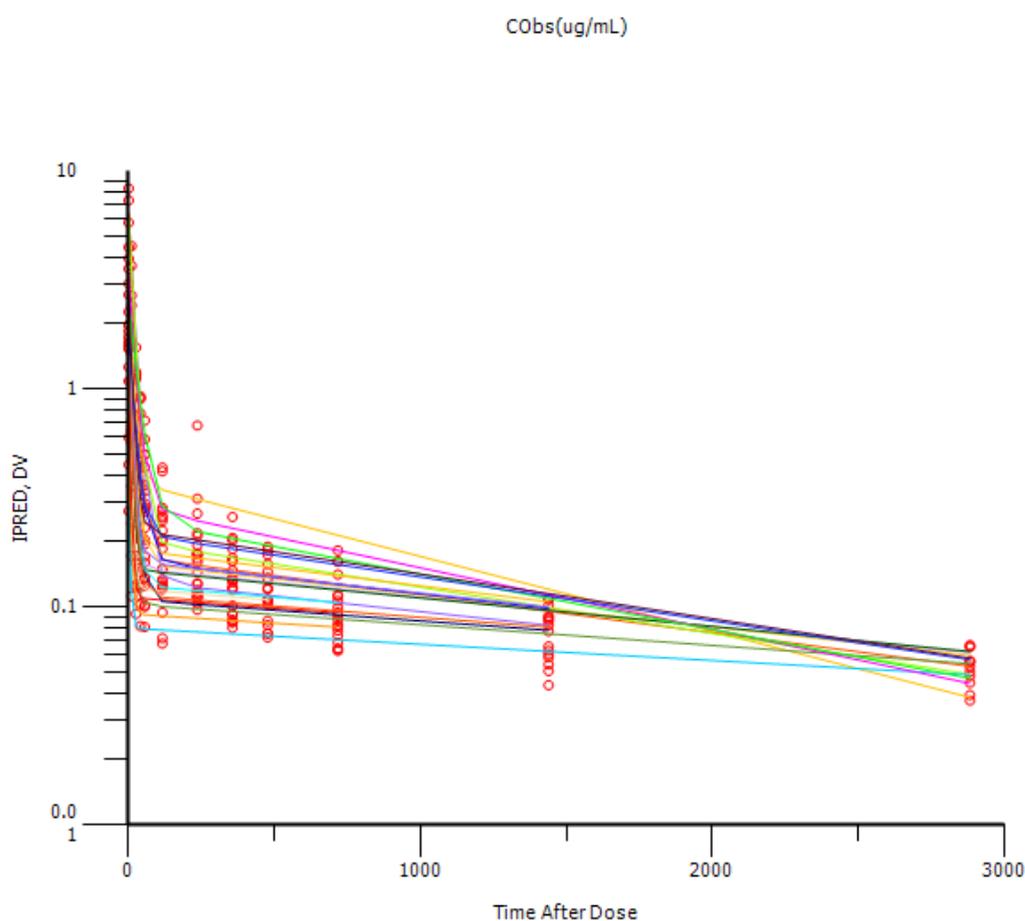


Figura 8 - Predições individuais (linhas), concentrações observadas (pontos) vs tempo para M2

A partir da figura 20 é possível observar uma melhora na predição dos últimos pontos, resultado da mudança no sistema de representação do erro residual em M2. O erro multiplicativo como citado acima é mais parcimonioso com os erros

presentes em concentrações menores, permitindo que o modelo tome uma característica mais perto da fisiológica nos animais do estudo.

A análise da variação da função objetiva (OFV), representado pela diferença no valor dos logaritmos de probabilidade demonstrou que M2 é um modelo que melhor prediz as condições dos dados comparados à M1. O teste de logaritmos de probabilidade é aplicado somente em modelos aninhados, e se baseia na teoria da convergência dos modelos mistos não lineares. Modelos com mais parâmetros derivados de modelos mais simples tendem a convergir igualmente ou melhor quando comparados com os modelos dos quais derivaram. Essa mudança utiliza o número de parâmetros utilizados no modelo como graus de liberdade e esse teste segue a distribuição de χ^2 . A mudança na OFV nessa comparação foi de 372.01, com seis parâmetros de diferença entre os modelos. O valor de p obtido para essa comparação foi de $2,88 \times 10^{-77}$, valor extremamente significativo. Isso demonstra que a mudança nos erros residuais foi extremamente positiva para o modelo, e essa será mantida nas análises seguintes.

Porém, pela análise do ajuste individual nos animais de M2 foi possível observar que o modelo bicompartimental, independentemente de sua parametrização, possui uma mudança de velocidades de decaimento as quais não estavam contemplando os dados de forma adequada. Alguns exemplos dessa situação estão presentes na figura 21.

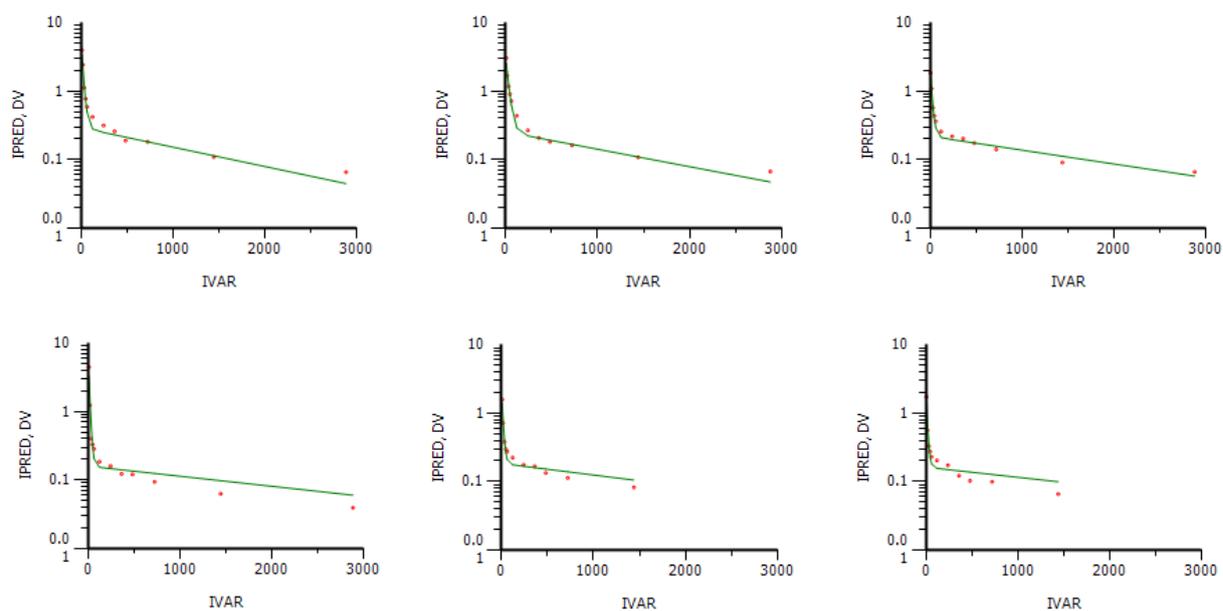
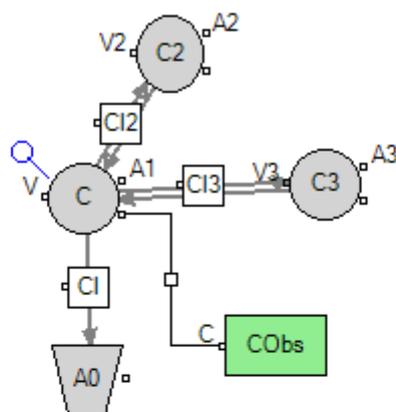


Figura 9 - Exemplos de ajustes individuais de concentração plasmática vs tempo de M2

Dessa maneira, a proposta de um terceiro compartimento foi considerada, o que atuaria diretamente no comportamento em que as mudanças de velocidade de decaimento são apresentadas.

O modelo tricompartmental M3 foi estruturado conforme demonstrado na figura 27.



Parameters:	Statements:
V	$\text{deriv}(A1 = -(CI * C) - (CI2 * (C - C2)) - (CI3 * (C - C3)))$
CI	$\text{urinecpt}(A0 = (CI * C))$
V2	$\text{deriv}(A2 = (CI2 * (C - C2)))$
CI2	$\text{deriv}(A3 = (CI3 * (C - C3)))$
V3	$C = A1 / V$
CI3	$\text{dosepoint}(A1, \text{idosevar} = A1\text{Dose}, \text{infdosevar} = A1\text{InfDose},$ $C2 = A2 / V2$ $C3 = A3 / V3$ $\text{error}(CEps = 0.183953)$ $\text{observe}(CObs = C * (1 + CEps))$

Figura 27 - Estrutura de M3

Além da melhora já obtida pela mudança do erro residual multiplicativo, aplicado em M2, foi possível observar que M3 apresentou gráficos de concentração plasmática vs tempo muito mais condizentes com os dados das duas formulações sendo modelados nesse estudo (figura 23)

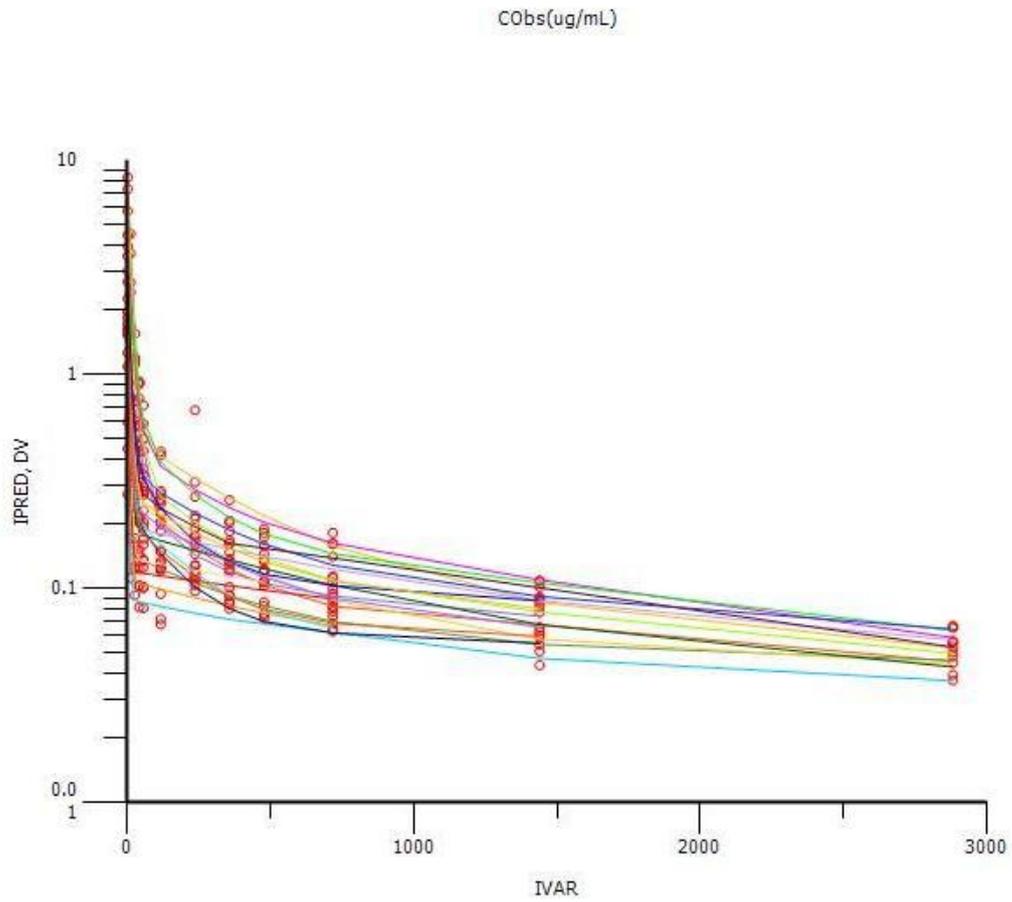


Figura 10 - Predições individuais (linhas), concentrações observadas (pontos) vs tempo de M3

O modelo apresentou curvas com melhores qualidades de ajuste do que os modelos anteriores tanto por análise visual quanto por análises por gráficos de resíduos ponderados. Ainda, foi realizada a comparação estatística entre M3 e M2 para se chegar à conclusão de qual modelo melhor representa os dados da AmB obtidos no estudo e a variação da função objetiva foi de 97,73 com 13 parâmetros a mais no M3, com valor de p de $4,58 \times 10^{-15}$. O valor de p demonstra que o modelo utilizando a farmacocinética tricompartmental representa muito melhor os dados obtidos no estudo. A farmacocinética tricompartmental da anfotericina B é citada em muitos estudos, fato que caracterizando sua longa meia-vida, especialmente em humanos onde β é de aproximadamente cinco dias (BEKERSKY, 2002). As curvas de concentração plasmática vs tempo obtidas através de M3 foram muito mais ajustadas quando comparadas aos outros modelos testados no estudo. Alguns exemplos dos ajustes estão apresentados na figura 24, em conjunto com gráficos de resíduos condicionalmente ponderados vs concentrações preditas (CWRES vs IPRED) por M3 e gráfico quantil-quantil (Q-Q) do modelo obtido (figura 25).

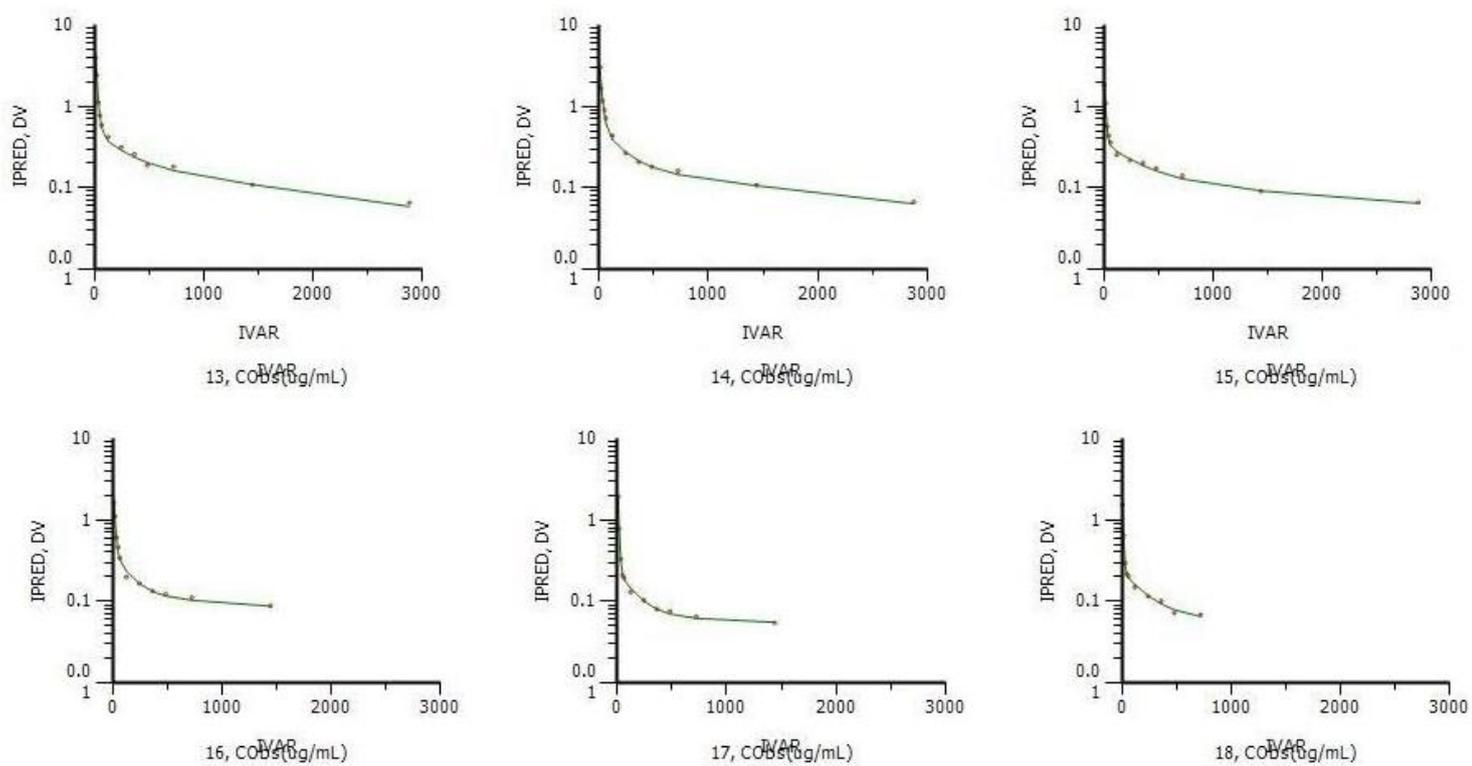


Figura 11 - Exemplos de ajuste de concentração plasmática vs tempo de M3

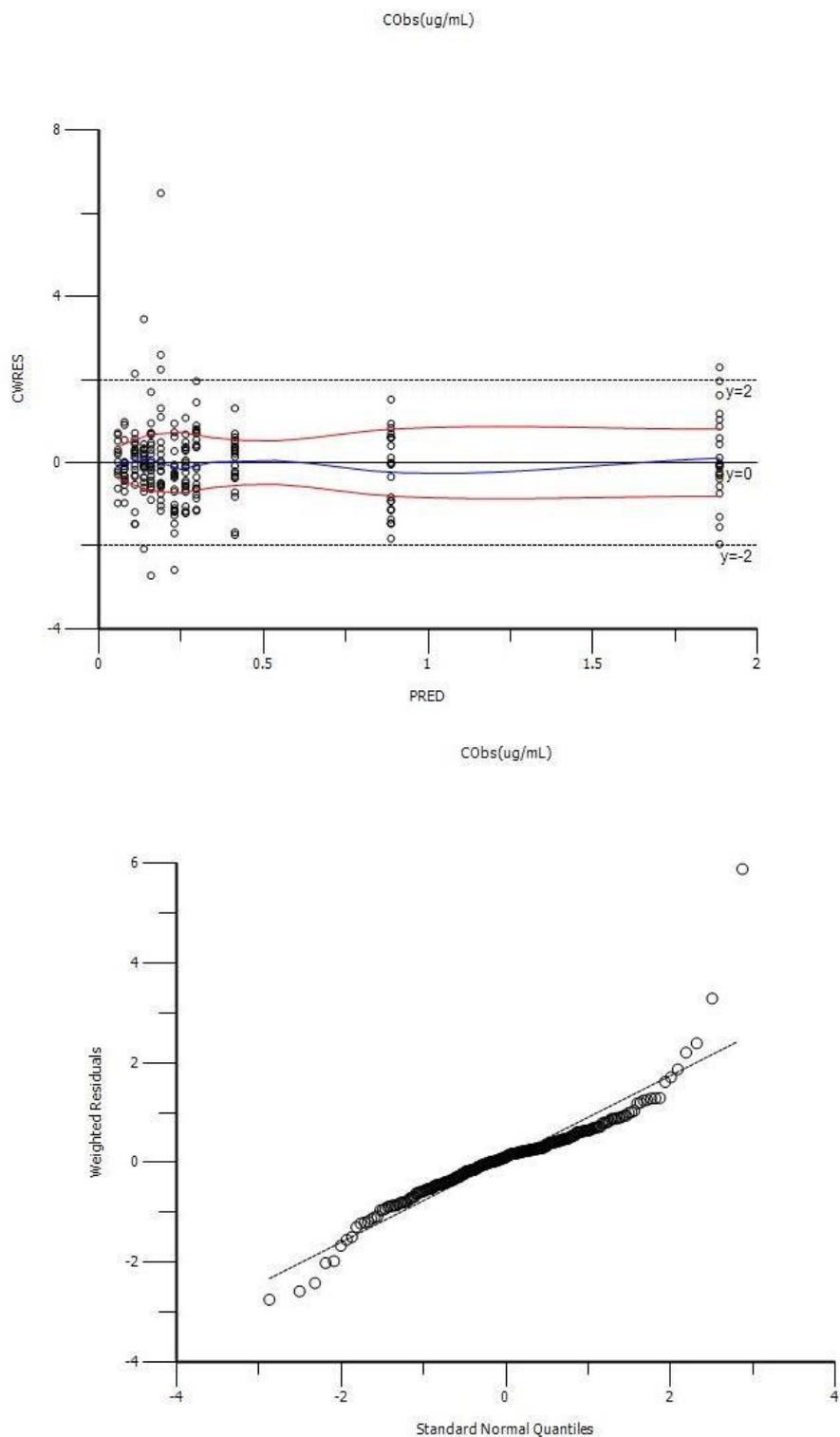


Figura 12 - CWRES vs IPRED e Q-Q de M3

Através da análise dos gráficos de *goodness-of-fit* foi possível observar que os resíduos ponderados estão centralizados, não apresentando tendências que podem prejudicar a predição do modelo. Da mesma forma o gráfico quantil-quantil dos resíduos ponderados demonstram um pequeno encaudamento em ambas as extremidades, porém a maioria dos pontos está dentro da predição de M3, sendo o modelo adequado para as predições da anfotericina B.

O modelo foi então validado através de reamostragem não paramétrica com 1000 replicatas utilizando-se M3, obtendo-se assim os parâmetros farmacocinéticos e seus respectivos intervalos de confiança.

Tabela 8 - Parâmetros farmacocinéticos obtidos através da reamostragem não paramétrica (Bootstrap, n = 1000).

Parâmetro	Média	DP	CV%	Mediana	2.5%	97.5%
tvV (mL/kg)	330.66	40.24	12.17	334.90	243.13	413.89
tvV2 (mL/kg)	1976.6 1	323.53	16.37	2030.72	1219.48	2595.01
tvV3 (mL/kg)	5846.5 7	1079.36	18.46	5494.75	4840.98	8817.88
tvCI (mL/min.kg)	1.52	0.16	10.68	1.55	0.98	1.70
tvCI2 (mL/min.kg)	22.49	4.07	18.12	23.36	12.07	29.63
tvCI3 (mL/min.kg)	4.98	0.87	17.41	4.87	3.60	7.21
stdev0 (%)	0.17	0.03	19.16	0.18	0.11	0.24

Através da reamostragem não paramétrica é possível observar que os coeficientes de variação para os parâmetros farmacocinéticos encontram-se abaixo dos 20%. Esses valores representam um bom encaixe do modelo apesar da grande

variabilidade entre os resultados obtidos nos grupos de animais e, conseqüentemente, nas 1000 replicatas obtidas através da reamostragem. Ainda, o modelo foi capaz de calcular com precisão os parâmetros como volumes de distribuição e clearance de compartimentos periféricos, os quais possuem usualmente uma maior variabilidade devido à incerteza presente em seus cálculos. Os parâmetros periféricos, especialmente o V_d periférico, não possuem uma ligação direta com as concentrações plasmáticas, fazendo com que as estimativas sejam calculadas indiretamente a partir dos níveis plasmáticos presentes no compartimento central, o que aumenta sua variabilidade em modelos com essa característica.

Além disso, foi possível observar que a distribuição dos parâmetros farmacocinéticos após a reamostragem possui uma distribuição relativamente normal, apesar do uso reduzido de animais quando comparado a outros estudos de farmacocinética populacional. A média final apresentada após a reamostragem mostra que apesar de não ser possível uma comparação estatística entre a análise de farmacocinética individual e os parâmetros obtidos pelo modelo, é possível observar que os parâmetros obtidos pelas duas formas são muito próximas, mesmo que no modelo tenham sido utilizados os dois grupos para a obtenção dos parâmetros populacionais para este estudo.

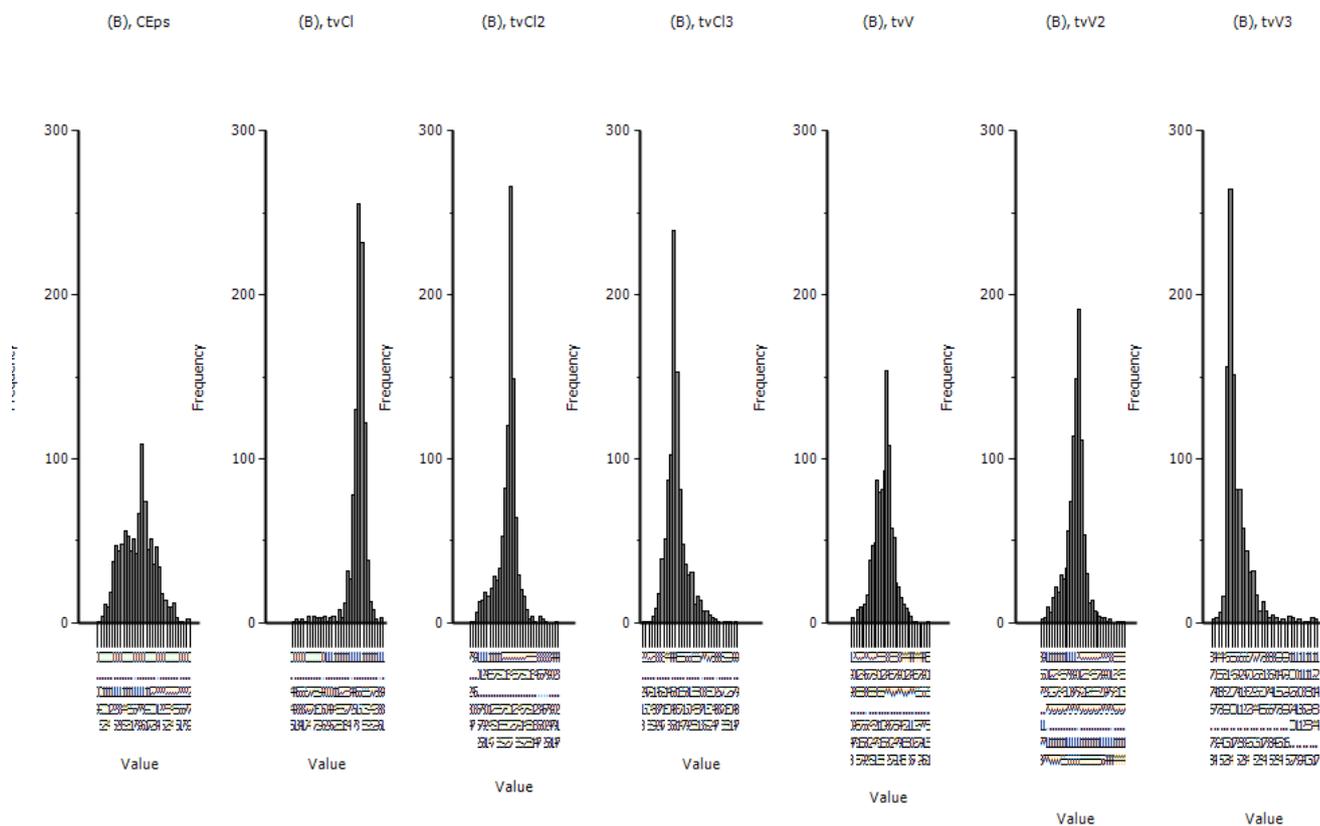


Figura 31 - Histograma dos parâmetros farmacocinéticos obtidos na reamostragem não paramétrica (n = 1000)

5.5.2 Modelo de covariáveis

5.5.2.1 Peso corporal

Após a validação do método foi iniciado o processo utilizar o modelo base M3 para a confecção de um modelo de covariáveis a fim de investigar se fatores inerentes ou não ao animal alteram a farmacocinética. A investigação de covariáveis é de suma importância na farmacocinética populacional visto que através dessa investigação é possível engendrar modelos que quando utilizados na simulação de diversos cenários respondam todas as questões sobre segurança e eficácia dos fármacos sendo estudados.

A primeira covariável a ser testada foi o peso dos animais. Todos os animais foram pesados logo antes do início das coletas para que os mesmos fossem utilizados como covariável no desenho dos modelos. O peso é uma variável contínua na qual utilizando sua mediana no grupo de animais, é possível centralizar os dados e observar se existem tendências de alteração dos parâmetros farmacocinéticos de acordo com a variação dessa característica fisiológica.

O peso então foi inserido no modelo M3, o modelo base de nosso estudo. Após sua inserção os gráficos de covariáveis vs parâmetros foram analisados para avaliar se havia alguma relação entre os mesmos (figura 31).

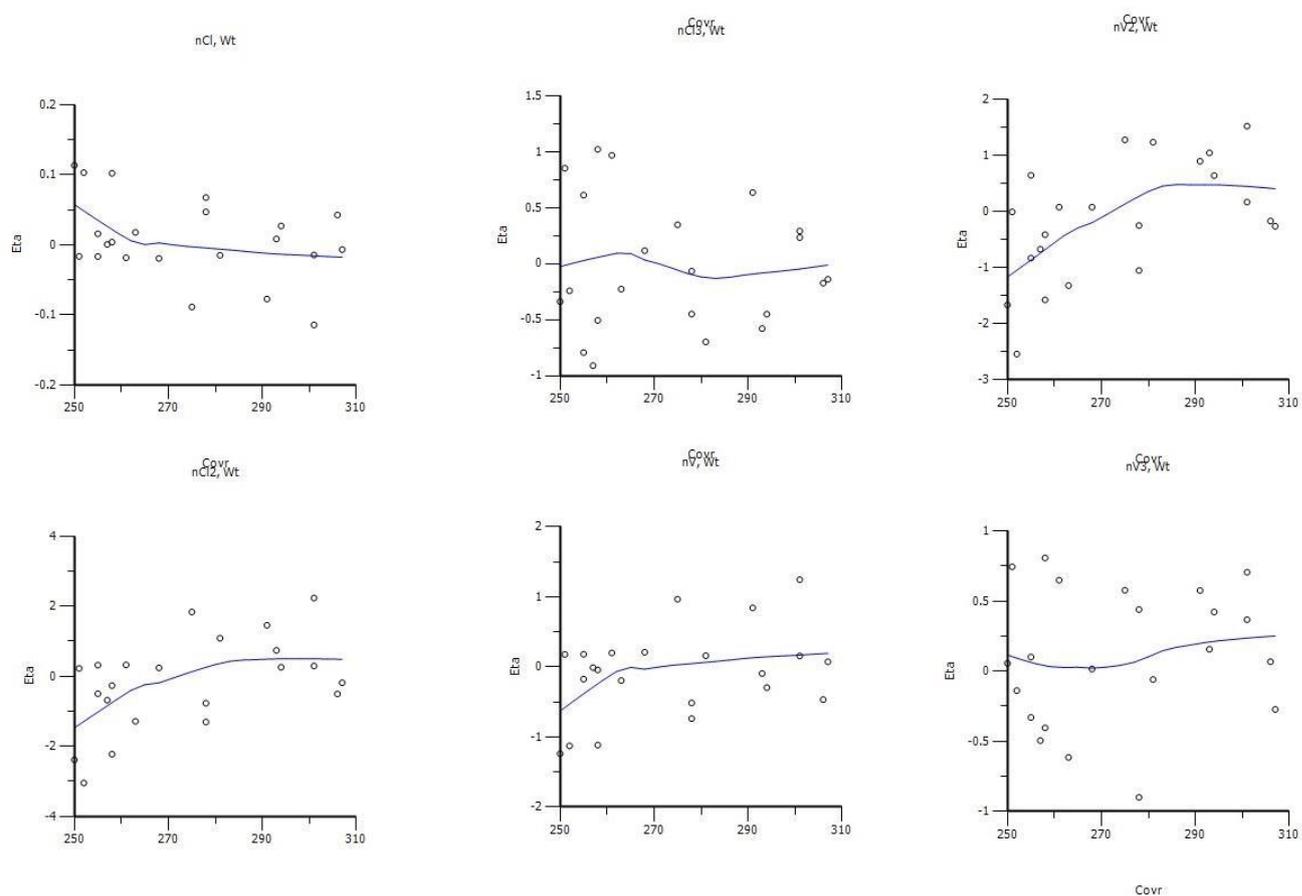


Figura 13 - Dispersão de covariáveis vs parâmetros farmacocinéticos.

Como é possível observar, não existem correlações significativas entre nenhum parâmetro farmacocinético e o peso dos animais. A única fraca correlação presente nas figuras está entre o peso corporal e o volume do compartimento periférico C2. No entanto, após o direcionamento do peso corporal em um modelo e sua comparação com o modelo base, o seu p foi de apenas 0,463, demonstrando que a inserção dessa covariável não foi significativa e segundo os dados modelados, essa inferência sobre aumento de volume periférico segundo o peso corporal não é válida. Existem casos como, por exemplo: um fármaco completamente excretado inalterado na urina é tão dependente do clearance de creatinina que a mesma pode, dependendo do modelo, ser inserida já no modelo base fazendo com que o modelo possua essa covariável tão indispensável já no início de sua confecção (BONATE, 2011). Dessa forma, fica evidente que para que ocorra uma melhora significativa em M3, o modelo de covariáveis deve apresentar características que possuam uma correlação muito intensa da mudança do fator fisiológico das covariáveis com os parâmetros farmacocinéticos.

5.5.2.2 Formulação como covariável

A teoria dos modelos mistos não lineares permite ainda o uso de ocasiões ou diferentes tratamentos como covariáveis. Dessa forma, as formulações foram tratadas como covariáveis categóricas, atribuindo uma transformação onde se o indivíduo recebeu Anforicin®, o software atribuía o número 0 nessa covariável, caso recebesse a MEAmB, o mesmo recebia um flag e o software o atribuía com o

número 1. A figura resultante dessa análise é chamada de *box plot* entre as covariáveis e os parâmetros farmacocinéticos (Figura 32).

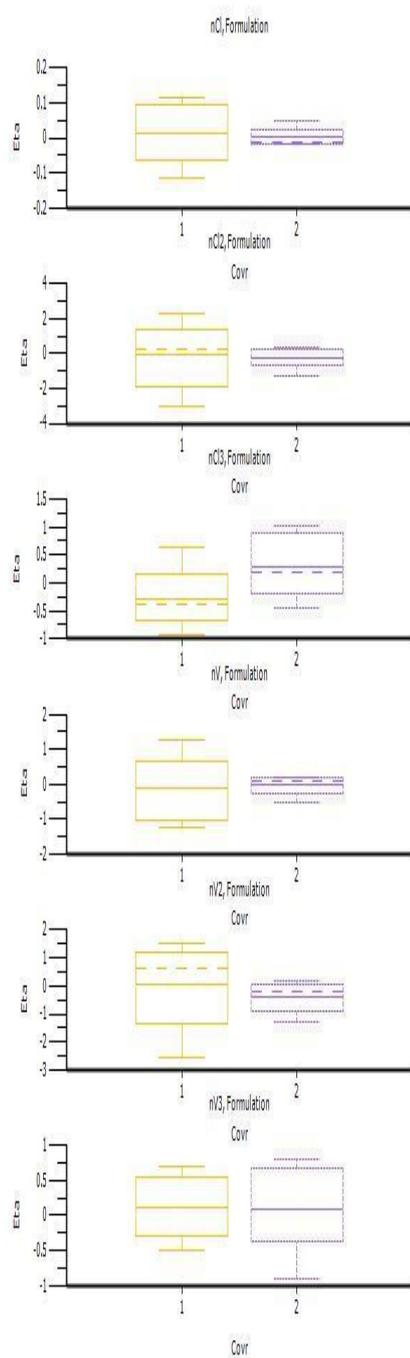


Figura 14 - Covariável formulação vs parametros farmacocinéticos

As covariáveis estão representadas pela cor mais clara a MEAmB e em escuro o Anforicin®. Através dessa figura é possível observar que a MEAmB possui uma maior variação quando comparada ao Anforicin®.

O padrão apresentado pelo gráfico nos mostra que na maioria dos casos, os parâmetros estão completamente alinhados quando as duas formulações são comparadas. Essa similaridade reforça o ponto de que a MEAmB apesar de ser uma formulação muito mais complexa, a mesma não altera de nenhuma forma os parâmetros farmacocinéticos, tendo impacto positivo apenas na toxicidade e mantendo as características farmacocinéticas já muito bem estudadas da AmB intocadas. Essa situação permite que estudos mais avançados sejam realizados com a formulação para que seja investigada mais profundamente seus potenciais efeitos tóxicos a longo prazo, já que a mesma diminuiu as reações agudas quando administrada intravenosamente em dose única.

Ainda que nenhum dos parâmetros tenha apresentado uma diferença estatística para que a formulação administrada fosse tratada como covariável e confeccionado um modelo para a mesma, é preciso que essa variação nos parâmetros seja observada.

6. CONCLUSÕES

- Um novo método bioanalítico foi validado para a quantificação da AmB em plasma de ratos por UPLC-UV. O método se mostrou robusto, preciso e exato.
- A formulação de AmB planejada e caracterizada por Franzini (2010) não proporciona aumento na biodisponibilidade oral do fármaco;
- Os parâmetros farmacocinéticos da AmB foram semelhantes na administração intravenosa para as duas formulações ;
- A administração da nova formulação de AmB pela via intravenosa não determinou o aparecimento de manifestações de desconforto nos animais nem alterações dos biomarcadores de função renal avaliados, sugerindo maior segurança quando comparada a formulação de AmB desoxicolato;
- Um modelo de farmacocinética populacional para AmB foi desenvolvido e validado para simulações e investigações de covariáveis para o uso em ratos que responderá futuras questões sobre diversos cenários no uso da nova formulação.

REFERÊNCIAS

AMORE, B.M.; GIBBS, J.P.; EMERY, M.G. Application of In Vivo Animal Models to Characterize the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drug Candidates in Discovery Settings. **Comb Chem High T Scr**, v.13, p. 207-218, 2010.

ARAÚJO, I. B. **Novos sistemas carreadores para anfotericina B: Estudo dos parâmetros tecnológicos e farmaco-toxicológicos**. Natal, 2005.112 f. Tese Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2005.

ASSUMPÇÃO, J.U.C.V et. al. Biocompatible microemulsion modifies the pharmacokinetic profile and cardiotoxicity of doxorubicin. **J. Pharm. Sci.**, v. 102, n.1, p. 289-296, 2012.

BARTNER E.; ZINNES H.; MOE R.A.; KULESZA J.S. Studies on a new solubilized preparation of amphotericin B. **Antibiot Annu**, v. 5, p. 53-58, 1957.

BEKERSKY, I.; FIELDING, R.M.; DRESSLER, D.E.; LEE, J.; BUELL, D.; WALSH, T. Pharmacokinetics, Excretion, and Mass Balance of Liposomal Amphotericin B (AmBisome) and Amphotericin B Deoxycholate in Humans. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.46, p. 828-833, 2002.

BONATE, P.L. **Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation.**

2nd. Ed. New York: Springer, 2011.

BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers.

Adv Drug Deliv Rev. v. 59, p. 645–666, 2007.

BRIME, B.; MOLERO, G.; FRUTOS, P.; FRUTOS, G. Comparative therapeutic efficacy of a novel lyophilized amphotericin B lecithin-based oil-water microemulsion and deoxycholate-amphotericin B in immunocompetent and neutropenic mice infected with *Candida albicans*. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 22, p. 451-458, 2004.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz fundamentals of clinical chemistry.**

5th. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. 1091p.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J.C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Rev Iberoam Micol.**, v. 23, p. 39-49, 2006.

CIPOLLE R.J.; SOLOMKIN, J.S. Amphotericin B. In: TAYLOR, W.J.; CAVINESS, N.H. **A textbook for the clinical application of therapeutic drug monitoring.**

Irving: Abbot laboratories, Diagnostics Division, 1986. p.321-328.

DUPONT, B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. **J. Antimicrob.**

Chem, v. 49, p. 31-36, 2002.

DI, L.; KERNS, E.H.; CARTER, G.T. Drug-Like Property Concepts in Pharmaceutical Design. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 19, p. 2184-2194, 2009.

DUTCHER J.D. The discovery and development of amphotericin B. **Dis Chest**. v. 54, n.1, 296-308, 1968.

EGGER, P.; BELLMANN, R.; WIEDERMANN, C. J., Determination of amphotericin B, liposomal amphotericin B, and amphotericin B colloidal dispersion in plasma by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v.760 n.2, p. 307-13, 2001.

ESPADA, R.; VALDESPINA, C.A.; RIVAS, G.; BALLESTEROS, M.P.; TORRADO, J.J. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. **Int. J. Pharm.**, v. 361, p.64-69, 2008.

ESPOSITO, E.; BORTOLOTTI, F.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R. Amphiphilic association systems for Amphotericin B delivery. **Int. J. Pharm.**, v.260, p. 249-260, 2003.

ETTE, E.I.; WILLIAMS, P.J. **Pharmacometrics: The Science of Quantitative Pharmacology**. Hoboken: Wiley, 2007.

FIELDING, R. M.; SMITH, P. C.; WANG, L. H.; PORTER, J.; GUO, L. S., Comparative pharmacokinetics of amphotericin B after administration of a novel colloidal delivery system, ABCD, and a conventional formulation to rats. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, n.6, p. 1208-13, 1991.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C.; Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Rev Bras Ciênc. Farm.** v. 42, p. 167-194, 2006.

FRANZINI, C.M. **Complexos de inclusão de anfotericina B com derivados de ciclodextrinas e sua incorporação em microemulsões lipídicas biocompatíveis.** Tese de doutorado 154 p. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho UNESP, 2011.

FUKUI, H.; KOIKE T.; SAHEKI, A.; SONOKE, S.; SEKI, J. A novel delivery system for amphotericin B with lipid nano-sphere (LNSR). **Int .J. Pharm.**, v. 265, p. 37–45, 2003.

GALLIS, H.A.; DREW, R.H.; PICKARD, W.W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Rev. Infect. Dis.** v. 12, p. 1165-1169, 1990.

Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). 2001. p. 25.

HARKNESS, J.E.; TURNER, P.V.;VANDEWOUDE, D.; WHELER, C.L. **Harkness and Wagner's Biology and Medicine of Rabbits and Rodents.** 5th. Ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. 472p.

HARTSEL, S.C.; BAAS, B.; BAUER E.; FOREE, L.T.; KINDT JR, K.; PREIS, H.; SCOTT, A.; KWONG, E.H.; RAMASWAMY, M.; WASAN, K.M. Heat induced superaggregation of amphotericin B modifies its interaction with serum proteins and lipoproteins and stimulation of TNF. **J. Pharm. Sci.**,v. 90, p.124-133, 2001.

HORTER, D.; DRESSMAN, J.B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, p. 75–87, 2001.

IBRAHIM, F.; GERSHKOVICH P.; SIVAK O.; WASAN, E.K.; WASAN, K.M. Pharmacokinetics and tissue distribution of amphotericin B following oral administration of three lipid-based formulations to rats. **Drug Dev Ind Pharm.** v. 39, n. 9, p.1277-1283, 2013.

JAMBOR W.P.; STEINBERG B.A.; SUYDAM L.O. Amphotericins A and B: two new antifungal antibiotics possessing high activity against deep-seated and superficial mycoses. **Antibiot Annu.** v. 3, p. 574-578, 1955.

KAWABATA, Y.; WADA, K.; NAKATANI, M.; YAMADA, S.; ONOUE, S. Formulation design for poorly water- soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications. **Int J Pharm.** v. 420, p. 1-10, 2011.

KOHLI, K.; CHOPRA, S.; DHAR, D.; ARORA, S.; KHAR, R.K. Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. *Drug Discov Today*, v. 15, p. 958–965, 2010.

KRAVETZ, H.M.; ANDRIOLE V.T.; HUBER M.A.; UTZ J.P. Oral administration of solubilized amphotericin B. *N Engl J Med*. v. 265, p. 183-224, 1961.

LAMBROS, M. P.; ABBAS, S. A.; BOURNE, D. W. New high-performance liquid chromatographic method for amphotericin B analysis using an internal standard. *J Chromatogr B Biomed Appl*, v.685, n.1, p. 135-40, 1996.

LEENDERS, A.C.A.P.; REISS, P.; PORTEGIES, P.; CLEZY, K.; HOP, W.C.J.; HOY, J. Liposomal amphotericin B (AmBisome) compared with amphotericin B both followed by oral fluconazole in the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis. *AIDS* v. 11, p. 1463-71, 1997.

LITTMAN M.L.; HOROWITZ P.L.; SWADEY J.G. Coccidioidomycosis and its treatment with amphotericin B. *Am J Med*. v. 24, n. 4, p. 568-592, 1958.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1: Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci* v. 85, p. 1017–1025, 1996.

LOURIA D.B. Some aspects of the absorption, distribution, and excretion of amphotericin B in man. *Antibiotic Med Clin Ther* v. 5, n. 5, p. 295-301, 1958

MENEZ, C.; LEGRAND, P.; ROSILIO, V.; LESIEUR, S.; BARRATT, G. Physicochemical characterization of molecular assemblies of miltefosine and amphotericin B. **Mol Pharm**, v. 4, p. 281–288, 2007.

MERHAV, H.; MIELES, L. Amphotericin B lipid complex in the treatment of invasive fungal infections in liver transplant patients. **Transplant Proc.** v. 29, n.6, p. 2670-2674, 1997.

MINONES, J. JR; CONDE, O.; DYNAROWICZ,-LATKA, P.; CASAS, M. Penetration of amphotericin B into DOPC monolayers containing sterols of cellular membranes. **Colloids Surf. A Physicochem Eng Asp.**, v.270-271, p. 129-137, 2005.

MORENO, M. A. Lyophilized Lecithin Based Oil-Water microemulsions as a new and low toxic delivery system for Amphotericin B. **Pharm. Res.** v. 18, p. 344-363, 2001.

MUELLER, E.A.; KOVARIK, J.M.; VAN BREE, J.B.; TETZLOFF, W.; GREVEL, J.; KUTZ, K. Improved dose linearity of cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. **Pharm Res.** v. 11, p. 301–304 1994.

MUÑOZ, P.; GUINEA, J.; NARBONA, M .T.; BOUZA, E. Treatment of invasive fungal infections in immunocompromised and transplant patients: AmBiload trial and other new data. **Int. J. Antimicrobiol. Agents.** v. 32, n.2, p. 125-131, 2008.

NASSAR, T.; ROMA, A.; NYSKA, A.; BENITA, S.; Novel double coated nanocapsules for intestinal delivery and enhanced oral bioavailability of tacrolimus, a P-gp substrate drug. **J Control Release**, v. 133, n. 1, p. 77-84, 2009.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V., CORREA, M.A, CERA, L.F.R., FORMARIZ, T.P. Microemulsoes: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim. Nova**. v. 27, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, A. G. ; CHIAVACCI, Leila A ; SCARPA, M. V. ; EGITO, E. S.T. . Microemulsions: physico-chemical approaches on the system for pharmaceutical applications. In: SONGJUN Li (Ed). (Org.). **Current focus on Colloids and Surfaces**. Kerala: Transword Research Network, 2009. v. 0, p. 57-84.

OSTERMANN, H.; BRYAN, J. New therapeutic approaches to managing invasive fungal Infections. **Int. J. Antimicrob. Agents**. v.30, p. 377-380, 2007.

PESTANA, K.C.; FORMARIZ, T.P.; FRANZINI, C.M.; SARMENTO, V.H.V.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A.G. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloids Surf. B Biointerfaces**., v. 66, n.2, p.253-259, 2008.

PFEIFER, C.; FASSAUER, G.; GERECKEA, H.; JIRA, T.; REMANEC, Y.; FRONTINI, R.; BYRNEA, J.; REINHARDT, R. Purity determination of amphotericin B, colistin sulfate and tobramycin sulfate in a hydrophilic suspension by HPLC. **J. Chrom B**, v. 990, p. 7–14, 2015.

PRENTICE, H.G.; HANN, I.M.; HERBRECHT, R.; AOUN, M.; KVALOY, S.; CATOVSKY, D. A randomized comparison of liposomal versus conventional amphotericin B for the treatment of pyrexia of unknown origin in neutropenic patients. **Brit J. Haematol**, v.98, p. 711-718, 1997.

RAJEWSKI, R.A.; STELLA, V.J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2: In vivo drug delivery. **J Pharm Sci**. v.85, p. 1142–1169, 1996.

RITCHIE T.J.; ERTL, P.; LEWIS, R. The graphical representation of ADME-related molecule properties for medicinal chemists. **Drug Discov Today**, v. 16, n.1-2, p. 65-72, 2011.

RODEN, M.M.; NELSON, L.D.; KNUDSEN, T.A.; JAROSINSKI, P.F.; STARLING, J.M.; SHIFLETT, S.E.; CALIS, K.; DECHRISTOFORO, R.; DONOWITZ G.R.; BUELL, D.; WALSH, T.J. Triad of Acute Infusion-Related Reactions Associated with Liposomal Amphotericin B: Analysis of Clinical and Epidemiological Characteristics. **Clin Infect Dis**. v. 36, n.10, p. 1213 – 1220, 2003.

SAAG, M.S.; DISMUKES, W.E. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 32, p. 1- 8, 1988.

SODRÉ, F. L.; COSTAS, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal. **J. Bras.Patol. Med. Lab**. v. 43, n.5, p. 329 – 337, 2007.

SPAMER, E.; MULLER, D.G.; WESSELS, P.L.W.; VENTER, J.P. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl-cyclodextrin and sulfobutyl ether-7-cyclodextrin. **Eur. J. Pharm. Sci.** v.16, n.4-5, p. 247-253, 2002.

TAKAGI, T.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; YAMASHITA, S.; YU, L.X.; AMIDON, G.L. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. **Mol Pharmacol.** v. 3, p. 631–643, 2006.

THORNTON, S.J.; WASAN, K.M. The reformulation of amphotericin B for oral administration to treat systemic fungal infections and visceral leishmaniasis. **Expert Opin Drug Deliv.** v. 6, 3, p. 271-284, 2009.

WALKER, D.K. The use of pharmacokinetic and pharmacodynamic data in the assessment of drug safety in early drug development. **Br J Clin Pharmacol.** v.58, n.6, p. 601-608, 2004.

WALSH, T.J.; FINBERG, R.W.; AMDT, C.; HIEMENZ, J.; SCHWARTZ, C.; BODENSTEINER, D. Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. **New Engl J Med**, v. 340, p. 764-771, 1999.

WATERBEEMD, H. V.; GIFFORD, E. ADMET in silico modeling: Towards prediction paradise? **Nat. Rev. drug Discov.** v.2, n.3.p.192-204, 2003.

WHITE, M.; ANAISSIE, E.J.; KUSNE, S.; WINGARD, J.R.; HIEMENZ, J.W.; CANTOR, A. Amphotericin B colloidal dispersion vs amphotericin B as a therapy for invasive aspergillosis. **Clin Infec Dis** v. 24, p. 635-42, 1997.

8 – ANEXOS

<http://aac.asm.org/>

Antimicrobial Agents and Chemotherapy Manuscript Submission and Peer Review System

[home](#) | [help for authors](#) | [help for reviewers](#) | [contact AAC™ staff](#) | [AAC™ home](#) | [logout](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	AAC01648-16
Current Revision #	0
Submission Date	2016-07-28 16:26:49
Current Stage	Under Review
Title	Preclinical Pharmacokinetic Application of a Fast, Simple and Sensitive New UHPLC Bioanalytical Method for Amphotericin B Quantification in plasma
Running Title	Amphotericin B quantification in plasma by UHPLC
Manuscript Type	Full-Length Text
Journal Section	Pharmacology
Corresponding Author	Prof. Rosângela Gonçalves Peccinini (Unesp - Univ Estadual Paulista)
Contributing Authors	Marco Antonio Ferraz Nogueira Filho , Ms. Martina Campana Borges , Elias Carvalho Padilha , Manuel Alejandro Henao Alzate
Abstract	<p>With the aim of reducing the analysis time and efficiency enhancing, the recent focus on high-speed chromatographic separations has grown substantially. The ultra-performance liquid chromatography (UHPLC) is known to provide better chromatographic resolution with reduced time of analysis and minimal solvent use. In this study we present the bioanalytical method designed to quantitate amphotericin B (AmB) in plasma in order to perform a pharmacokinetic analysis of the commercial deoxycholate AmB formulation in rats and compared it with a new formulation consisted of a microemulsion system. Reproducible standard curves were obtained over the range 0.05 to 1 µg/mL using UV detection at 407nm. 100 µL of acetonitrile was used as extractor liquid added with nifedipine (20µg/mL) as an internal standard at 1:1 proportion in 100µL of rat plasma. Intra- and inter-run accuracy levels were 103% ± 4% and 104% ± 4%. The intra- and inter-run coefficients of variation were 4% ± 1% and 2% ± 4%. The UPLC-UV method quantified the AmB in blood samples throughout 48h of the pharmacokinetic study which allowed the calculations of the pharmacokinetic parameters for both formulations intravenous administration at 1 mg/kg.</p>
Editor	Dr. David Andes
Suggested Reviewers to Include	Vera Lanchote (Sao Paulo University), Amobio Silva (Federal University of Rio Grande do Norte), Silvia Storpirtis (Sao Paulo University)
Suggested Reviewers to Exclude	N/A
Keywords	amphotericin B, bioanalytical method, pharmacokinetics, new formulation
Research Areas	Pharmacology, Antimicrobial Chemotherapy
Conflict of Interest	No conflict of interest.
Preprint Server	No
Funding Sources	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) ✓ : Marco Antonio Ferraz Nogueira Filho, Martina Campana Borges, Manuel Alejandro Henao Alzate Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) ✓ : Elias Carvalho Padilha, Rosângela Gonçalves Peccinini
Electronic Forms	1 of 1 forms complete - View Electronic Forms Status

Stage	Start Date
Under Review	2016-07-28 16:43:02
Reviewing Editor Assigned	2016-07-28 16:43:02
Initial QC	2016-07-28 16:26:52
Manuscript Submission Incomplete	2016-07-28 14:56:28

[home](#) | [help for authors](#) | [help for reviewers](#) | [contact AAC™ staff](#) | [AAC™ home](#) | [logout](#)

TERMS OF SERVICE
Licensed under Patent #US 7,620,555B1

eJournalPress

Preclinical Pharmacokinetic Application of a Fast, Simple and Sensitive New UHPLC Bioanalytical Method for Amphotericin B Quantification in plasma

Marco Nogueira Filho*, Martina Borges, Elias Padilha, Manuel Alzate, and Rosângela Peccinini*.

¹ –Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus Araraquara, Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Araraquara - SP, Brazil.

Running Title: Amphotericin B quantification in plasma by UHPLC

*Address correspondence to:

Marco Antonio Ferraz Nogueira Filho - nogueira.maf@gmail.com

RosângelaPeccinini - peccinin@fcar.unesp.br

Keywords: amphotericin B, UPLC method, pharmacokinetics, new formulation, fungal infection treatment.

Marco Antonio Ferraz Nogueira Filho

E-mail address: nogueira.maf@gmail.com

Martina Campana Borges

E-mail address: martinacampborges@gmail.com

Elias Carvalho Padilha

E-mail address: eliascarvalho@gmail.com

Manuel Henao Alzate

E-mail address: manuelhenao888@hotmail.com

Rosângela Gonçalves Peccinini

E-mail address: peccinin@fcfar.unesp.br

ABSTRACT

With the aim of reducing the analysis time and efficiency enhancing, the recent focus on high-speed chromatographic separations has grown substantially. The ultra-performance liquid chromatography (UHPLC) is known to provide better chromatographic resolution with reduced time of analysis and minimal solvent use. In this study we present the bioanalytical method designed to quantitate amphotericin B (AmB) in plasma in order to perform a pharmacokinetic analysis of the commercial deoxycholate AmB formulation in rats and compared it with a new formulation consisted of a microemulsion system. Reproducible standard curves were obtained over the range 0.05 to 1 ug/mL using UV detection at 407nm. 100 uL of acetonitrile was used as extractor liquid added with nifedipine (20ug/mL) as an internal standard at 1:1 proportion in 100uL of rat plasma. Intra- and inter-run accuracy levels were $103\% \pm 4\%$ and $104\% \pm 4\%$. The intra- and inter-run coefficients of variation were $4\% \pm 1\%$ and $2\% \pm 4\%$. The UPLC-UV method quantified the AmB in blood samples throughout 48h of the pharmacokinetic study which allowed the calculations of the pharmacokinetic parameters for both formulations intravenous administration at 1 mg/kg.

INTRODUCTION

The incidence of invasive fungal infections has increased over the past decades. This is due to a higher number of at-risk immunocompromised individuals, such as patients with acute leukemia undergoing myelosuppressive chemotherapy or allogeneic stem cell transplantation¹. Invasive mycoses are associated with high mortality rates and health care costs. With the emergence of rare and unusual fungal infections, it is critical to provide appropriate treatment regimens. As a class, polyenes are well known broad-spectrum antifungals with a long history of clinical use².

Amphotericin B (AmB) is a polyene antifungal agent and it is the most important antifungal drug in the treatment of invasive aspergillosis³. It is an amphoteric molecule, presents a very lipophilic characteristic and interacts with fungal cell membrane, forming pores and disrupting its integrity⁴. AmB demonstrates a broad spectrum of antifungal activity due to its mechanism of action and physicochemical properties.

Conventional deoxycholate amphotericin B (AmB-D) is associated with a high incidence of nephrotoxicity and infusion-related reactions, which limit its use and often require dose reduction (Klepser)². Lipid formulations of amphotericin B were developed in the 1990s and when compared with amphotericin B-deoxycholate, lipid formulations of amphotericin B are better tolerated, allowing higher doses to be administered (Deray)⁵. Besides the new lipid based products, new formulations are

being researched to improve the pharmacokinetic characteristics of AmB which could provide new administration alternatives, since AmB's only administration form is intravenously.

A new system for AmB veiculation was developed in the pharmacotechnology laboratory located in São Paulo State University (UNESP, Brazil), which involved obtaining the complexation of AmB with β -cyclodextrin and subsequently incorporating this complex in a microemulsion release system (MEAmB). Cyclodextrins are known to be useful pharmaceutical excipients providing a variety of physical and chemical advantages, including the possibility of increased water solubility, solution stability and bioavailability⁶. After characterization assays of the proposed formulation, was concluded that the AmB system showed great potential as drug delivery system, a situation that in theory, would improve the undesirable characteristics of AmB.

For years, the HPLC with UV detection was used in large scale for drug quantification. A great number of analytical methods published require high sample volumes and run time above 10 minutes^{7,8,9}. With smaller particle size, operating at higher pressures than those used in regular HPLC, the UPLC provides sharper peaks in a shorter run time and with less plasma constituents interference.

The aim of the current study was to develop and validate a faster, simple, reliable and robust UPLC bioanalytical method for the quantification of AmB in plasma. Normally, the sample preparation for liquid chromatography requires complex extraction procedures such as solid phase extraction or liquid-liquid extraction for the proper injection in the separation system. These extraction procedures consume time and reagent, and in this study, a simple protein precipitation extraction procedure

was also validated, which reduces the overall time for the data outcome. Using the method to assess the pharmacokinetics of the conventional deoxycholate formulation (D-AmB) and compare it to the pharmacokinetic disposition of the microemulsion (MEAmB).

MATERIAL AND METHODS

Ethics statement

This study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Pharmaceutical Sciences of the São Paulo State University (Araraquara, Brazil) (protocol 63/2013).

Materials.

Amphotericin B and nifedipine (internal standard) in analytical grade powder were used in the UPLC method validation and purchased from Sigma Co. (Australia). HPLC-grade acetonitrile was purchased from J.T. Baker. Purified water was produced by using a Milli-Q reagent system (Millipore, MA).

Standards.

The standard stock solution of amphotericin B (100 μ g/mL) was prepared by dissolving 10 mg of amphotericin B in 100mL of methanol and stored at 4°C. The

nifedipine (internal standard) stock solution was prepared by dissolving 10mg of nifedipine in 100mL of acetonitrile. The standard curve for amphotericin B was constructed by spiking blank rat plasma with the stock solution giving a calibration range of 0.05 to 1 μ g/mL. The internal standard working solution was prepared using the stock solution and acetonitrile to achieve a 20 μ g/mL solution.

Validation.

The calibration curves for AmB were constructed by least-squares linear regression analysis of a six-point calibration curve (0.05 - 1 μ g/mL) by plotting the ratio of the analyte peak area to the IS peak area. Calibrator response functions and choice of regression analysis were investigated by calculating correlation coefficients (r^2) and the percent closeness of the mean observed concentration relative to the nominal (%DEV) for all calibrators. The lower limit of quantitation (LLOQ) was defined as the lowest calibration standard capable of producing a peak with a signal-to-noise (S/N) ratio of ≥ 5 according to the U.S. Food and Drug Administration "Guidance for Bioanalytical Method Validation" ¹⁰, the mean value determined at LLOQ should not exceed 20% of the coefficient of variation (CV).

Quality control was assessed using the concentrations 0.1, 0.25 and 0.75 μ g/mL running quintuplicates of each concentration to intra and interday analysis. Dilution quality control was performed using 10 μ g/mL as a maximum dilution point for possible concentrations that might exceed 1 μ g/mL in the pharmacokinetic experiment. The lowest concentration for the standard curves of AmB was considered to be the lower limit of quantitation (LLOQ) The lower limit of quantitation (LLOQ) was defined as the lowest calibration standard capable of producing a peak with a signal-to-noise (S/N) ratio of ≥ 5 .

The carryover effect was investigated in order to certify that previously injected samples do not affect the signal of other analysis. The carryover assay was performed by the injection of one blank plasma sample, followed by the higher concentration of the curve (1 µg/mL) and another two blank plasma samples. The areas of the blank samples were compared to the first blank injected in the experiment.

Animals.

10 Male wistar rats, 2 months old weighing 250g (\pm 25g), were used and maintained according to guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The animals were maintained in a separated room with 12h regular light and dark alternating cycles at a temperature of 23°C \pm 2°C. The food and water were given to the animals *ad libitum*.

Pharmacokinetic experimental design.

The experiment consisted of two groups of 5 animals which received an intravenous single dose of 1 mg/kg of AmB deoxycholate or microemulsion by slow injection (5 min).

The animals underwent a surgical procedure prior to the AmB administration to implant surgical polyethylene tubes in the femoral vein and artery for the intravenous drug administration and arterial blood collection. After the procedure, the animals were kept in individual housing during 24 hours for the recovery period and also throughout the pharmacokinetic experiment period.

To determine the AmB levels in the plasma, heparinized polypropylene tubes were used for the collection of 250 µL of blood obtained directly from the surgical tube. The

times for the collection of samples used for the construction of the pharmacokinetic curves were 5, 15, 30, 45, 60 minutes, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h and 48h. With the surgical tube implants a single animal were able to provide an entire curve in the pharmacokinetic experiment.

Sample treatment.

The plasma from the samples were separated by centrifuging at 2000 xg for 10 minutes and stored in -20°C freezer for later extraction and quantification. 100 µL of nifedipine solution in acetonitrile was added to 100µL of the plasma samples. The mixture was briefly vortexed and centrifuged at 15,000xg for 15 minutes. 125 µL of the supernatant was filtered in a 0.22 µm syringe sample filter and injected into the UPLC system.

Instrument conditions.

UPLC analysis were performed through the injection of 5µL in an Acquity UPLC Waters® (Waters, MA) series equipped with a quaternary pump, a variable wavelength detector set at 407nm, with the samples stored at 10°C inside the sample manager module. Amphotericin B and nifedipine (internal standard) were separated under isocratic elution using a Waters® Acquity CSH C18 1.7µm 2.1 x 100 mm and guard column Waters® Acquity CSH C18 1.7µm 2.1 x 5mm (Waters, MA). The mobile phase consisted of line A: formic acid 0.1% solution and line B: acetonitrile (38:62) with the column temperature set at 45°C. The flow rate was set at 0.4 mL/min

and the total analysis time for each sample was 5 min. The chromatographic output was analyzed by the software Waters® Empower v.3.0.

Pharmacokinetic data and statistical analysis.

The pharmacokinetic study was carried out comparing the profiles of the administration of commercial AmB deoxycholate product and the new AmB microemulsion formulation under the same dose (1 mg/kg). The pharmacokinetic calculations were made in the Phoenix WinNonlin® 6.2.1 (Pharsight Corp., Mountain View, CA, USA) software by employing compartmental analysis in the data collected from both administrations, obtaining the pharmacokinetic parameters. The pharmacokinetic parameters were confirmed by calculations in the Microsoft Excel®, PK solver addin. The half-lives were calculated based on the $0.693 / k$ equation. The areas under the plasma concentration-time curves (ASC_{0-48h}) were calculated by the trapezoidal method and the AUC_{0-∞} was calculated by the equation $AUC_{0-∞} = ASC_{0-48h} + C_n / k_{el}$, where C_n is the last plasma concentration, k_{el} the elimination constant in the terminal phase. For the calculation of the total clearance $Cl = dose / AUC_{0-∞}$ and equation will be used to calculate the apparent volume of distribution, $V_d = Cl / k_{el}$. The pharmacokinetic parameters obtained in the study are presented as means and standard deviations (SD). The data were analyzed by Mann-Whitney for multiple comparisons. Analyzes were performed by Graphpad Prism 5.01 (Graphpad Software Inc. San Diego, CA).

RESULTS AND DISCUSSION

Selectivity

The retention times of amphotericin B and nifedipine, were 1.93 and 4.10 min, respectively (Figure 1). The use of UHPLC provided sharp, symmetrical peaks that were well-resolved and separated from interfering matrix peaks that were eluted following the plasma administration.

Validation

The calibration standards, ranging from 0.05-1.0 µg/mL, were run in duplicate on each of four days (n=8). The eight calibration standards proved accurate and precise, with a mean (\pm SD) calibration curve linear correlation (r^2) of 0.9972 ± 0.0017 (n=4). Four quality control (QC) samples, at LQC, MQC, HQC, and DQC (10-fold diluted concentrations), plus LLOQ, were run in quintuplet daily over four days. All QC levels proved accurate and precise, within the required $\leq 15\%$ ($\leq 20\%$ for LLOQ samples) (Table 1).

Stability

AmB demonstrated sufficient bench-top stability in plasma through 24 h, with $< 9\%$ difference in measured concentrations from freshly extracted samples at both low and high concentrations. Three freeze/thaw cycles had a negligible impact ($< 15\%$) on AmB stability at the MQC and HQC controls, except at the low QC, where the difference was greater than 15%. This suggests that samples thawed more than once should not be analyzed. The 24 h post-preparative measurements were within acceptable limits ($< 15\%$ change).

Extraction Efficiency / Matrix interference / Carryover

The mean overall recoveries for amphotericin B, estimated by comparing the signal response of the analyte spiked into rat plasma before extraction versus analyte spiked after extraction at both a low (0.1 µg/mL) and a high (0.75 µg/mL) concentration, were 89 and 92% respectively. The method presented no significant matrix interference in the analyte and internal standard retention times, this instrument sensitivity, and excellent extraction recovery, allowed for a LLOQ of 0.05 µg/mL. Furthermore, the method presented no carryover effect after the injection of the highest concentration of the curve (1 µg/mL).

Pharmacokinetic clinical application

This UHPLC assay was able to selectively identify and quantitate amphotericin B in rat plasma following in vivo intravenous administration of D-AmB and MEAmB. Following a 1 mg/kg dose measured plasma concentrations were above the LLOQ at 48 h post dose, but not beyond that, showed on the pilot study (Figure 2). AmB presented a biphasic elimination, with a half-life of 28.8 and 34.4h (1732.5 and 2069.1 min) for D-AmB and MEAmB respectively, showing no statistical differences between the two formulations. The distribution parameters such as Vd and t_{1/2}α presented no statistical differences, showing that although the MEAmB is a much more complex formulation matrix than AmB-D, this fact does not interfere on the time that the drug distribution to different tissues takes (t_{1/2}α = 13.07 vs 13.32 minutes for AmB-D and MEAmB respectively) or even the extension of this

distribution for different tissues ($V_d = 5682.23$ vs 5969.28 mL/kg for AmB-D and MEAmB respectively). The extensive distribution showed for the animal model indicates extravascular accumulation and is compatible with previous AmB studies in rats¹¹. Also, the elimination parameters, Cl (1.72 vs 1.85 mL/min.kg) and Kel (0.0004 vs 0.0003 min⁻¹), presented no statistical differences denoting that the complex matrix present in the microemulsion system did not affect the elimination process of amphotericin B. Additionally, the mean residence time (MRT) presented no statistical difference between the groups, showing that despite the AmB-ME requires the drug liberation from the microemulsionated system, this fact does not impact the overall disposition of AmB, not altering its reliable and well-studied pharmacokinetics. Furthermore, the animals receiving AmB-D presented the classical acute reactions from its intravenous administration such as ataxia and dyspnea for about 15 minutes after the end of the infusion, and in some cases the injection was lethal to the animals. On the other hand, the MEAmB presented no physical manifestation of any of these effects throughout the entire experiment. Although this is an anecdotal evidence, presenting less acute reactions is compatible with the general AmB lipid-based formulation behavior after intravenous administration, including a lower accumulation of amphotericin B in the lungs, which lead to the major toxic event after AmB-D administration¹¹ in this study.

CONCLUSION

In conclusion, this simple, sensitive, robust, and reproducible for the quantitation of the amphotericin B was accurate and precise, and the calibration range was

sufficient to monitor plasma levels following a 1 mg/kg dose given to rats intravenously in two different formulations in this study. The method presented high sensitivity and selectivity and also an easy and quick extraction that allowed the monitoring of the pharmacokinetic profile of AmB. Also, as this method is easily transferable to humans, it is a valuable tool for the often required therapeutical monitoring in the AmB treatment for invasive fungal infections (IFI's), due to the short analysis time.

The microemulsion formulation presented a similar pharmacokinetic disposition compared to the AmB-D, denoting that the new microemulsion formulation does not impact the already well-studied amphotericin B disposition behavior after intravenous administration. This fact coupled with the reduction of the acute reactions presented by the animals during the intravenous administration

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Dr. A. Oliveira for providing the microemulsion for this study.

REFERENCES

1. Sandherr, M.; Maschmeyer, G., Pharmacology and metabolism of voriconazole and Posaconazole in the treatment of invasive aspergillosis: review of the literature. *Eur J Med Res* **2011**, *16* (4), 139-44.
2. Klepser, M., The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. *J Crit Care* **2011**, *26* (2), 225.e1-10.
3. Walsh, T. J.; Anaissie, E. J.; Denning, D. W.; Herbrecht, R.; Kontoyiannis, D. P.; Marr, K. A.; Morrison, V. A.; Segal, B. H.; Steinbach, W. J.; Stevens, D. A.; van Burik, J. A.; Wingard, J. R.; Patterson,

T. F.; America, I. D. S. o., Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **2008**, *46* (3), 327-60.

4. Moore, C. B.; Sayers, N.; Mosquera, J.; Slaven, J.; Denning, D. W., Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. *J Infect* **2000**, *41* (3), 203-20.

5. Deray, G., Amphotericin B nephrotoxicity. *J Antimicrob Chemother* **2002**, *49 Suppl 1*, 37-41.

6. Spamer, E.; Müller, D. G.; Wessels, P. L.; Venter, J. P., Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and sulfobutyl ether-7-beta-cyclodextrin. *Eur J Pharm Sci* **2002**, *16* (4-5), 247-53.

7. Egger, P.; Bellmann, R.; Wiedermann, C. J., Determination of amphotericin B, liposomal amphotericin B, and amphotericin B colloidal dispersion in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **2001**, *760* (2), 307-13.

8. Espada, R.; Josa, J. M.; Valdespina, S.; Dea, M. A.; Ballesteros, M. P.; Alunda, J. M.; Torrado, J. J., HPLC assay for determination of amphotericin B in biological samples. *Biomed Chromatogr* **2008**, *22* (4), 402-7.

9. Lambros, M. P.; Abbas, S. A.; Bourne, D. W., New high-performance liquid chromatographic method for amphotericin B analysis using an internal standard. *J Chromatogr B Biomed Appl* **1996**, *685* (1), 135-40.

10. Center for Drug Evaluation and Research (U.S.); Center for Veterinary Medicine (U.S.), Guidance for industry

bioanalytical method validation. U.S. Dept. of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research : Center for Veterinary Medicine, : Rockville, MD, 2001; p. 1 online resource (22 p. <http://purl.access.gpo.gov/GPO/LPS120397>).

11. Fielding, R. M.; Smith, P. C.; Wang, L. H.; Porter, J.; Guo, L. S., Comparative pharmacokinetics of amphotericin B after administration of a novel colloidal delivery system, ABCD, and a conventional formulation to rats. *Antimicrob Agents Chemother* **1991**, *35* (6), 1208-13.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Chromatograms of wistar rats plasma showing the bioanalytical method selectivity for AmB quantification. Chromatogram 1: blank plasma; Chromatogram 2: 0.5 ug/mL AmB extracted with nifedipine (20ug/mL) in ACN.

Figure 2. Pharmacokinetic profile following 1mg/kg intravenous administration of AmB-D and MEAmB in wistar rats (mean \pm CI95, n=10, n=5 each group).

TABLES

Table 1 - Precision and Accuracy of the UPLC bioanalytical method. Intra-run was assessed by 5 replicates of each QC divided equally in 3 runs in a single day and inter-run, 5 replicates of each QC in 3 different days.

Amphotericin B Bioanalytical Method Validation Data							
Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Grand Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	DEV	RSD	WRP	BRP	n
0.05	0.0537	0.0036	7.73%	6.73	6.65	1.19	20
0.1	0.1009	0.0057	1.04%	6.26	6.18	1.20	20
0.5	0.5028	0.0171	0.99%	3.80	3.33	2.06	20
0.75	0.7549	0.0249	1.54%	3.39	3.53	-	20

SD – Standard Deviation, DEV – % Deviation from nominal concentration, RSD – Relative Standard Deviation, WRP – Within Run Precision, BRP – Between Run Precision. A hyphen means $wgMS > bgMS$, thus producing a negative number and cannot take square root of a negative number. In this case “no additional variation was observed as a result of performing the assay in different runs.”

Table 2 - Pharmacokinetic parameters obtained from the AmB-D and MEAmB 1 mg/kg intravenous administration in wistar rats (n = 5)

Pharmacokinetic parameter	AmB-D (i.v.)	MEAmB (i.v.)
auc 0-inf ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)	425.43 480.28 (388.43-572.12)	538.19 546.95 (498.46-595.43)
β (min ⁻¹)	0.0004 0.00037 (0.00030 – 0.00045)	0.0003 0.00031 (0.00027 – 0.00035)
$t_{1/2 \beta}$ (min)	1732.5 1944.22 (1508.50 – 2379.94)	2069.11 2293.87 (1954.41 – 2633.32)

Cl (mL/min.kg)	1.72 1.87 (1.63 – 2.11)	1.85 1.83 (1.68 – 1.98)
Vd (mL/kg)	5683.23 5296.45 (3906.38 – 6686.52)	5969.28 5988.17 (5517.25 – 6459.08)
MRT (min)	2212.35 2446.20 (1815.96 – 3046.45)	2271.02 1980.85 (1183.89 – 2778.14)
α (min⁻¹)	0.053 0.0504 (0.039 – 0.061)	0.052 0.050 (0.042 – 0.058)
$t_{1/2 \alpha}$ (min)	13.07 14.77 (11.24 – 18.31)	13.32 14.31 (12.02 – 16.61)

AUC, Area under the curve; β , elimination constant; $t_{1/2 \beta}$, elimination half-life; Cl, total clearance; V_d , volume of distribution; MRT, mean residence time; α , distribution constant; $t_{1/2 \alpha}$, distribution half-life; statistical analysis performed by Mann-Whitney test

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 22/2013

Interessado: MARCO ANTONIO FERRAZ NOGUEIRA FILHO

Orientador: Profª. Drª. Rosângela Gonçalves Peccinini

Projeto: Farmacocinética pré-clínica e avaliação de segurança e eficácia de inovadora formulação de anfotericina B

Parecer nº 62/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa "Farmacocinética pré-clínica e avaliação de segurança e eficácia de inovadora formulação de anfotericina B", apresentado pelo pós-graduando MARCO ANTONIO FERRAZ NOGUEIRA FILHO, sob orientação da Professora Doutora Rosângela Gonçalves Peccinini, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em AGOSTO de 2016, em formulário para este fim.

Araraquara, 1º de novembro de 2013.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA