



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Farmacocinética do efavirenz em coelhos: estudo comparativo do insumo farmacêutico ativo e dispersão sólida polimérica

Jonata Augusto de Oliveira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosângela Gonçalves Peccinini

**Araraquara-SP
2018**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Jonata Augusto de Oliveira

**Farmacocinética do efavirenz em coelhos: estudo comparativo do
insumo farmacêutico ativo e dispersão sólida polimérica**

Prof^a. Dr^a. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara-SP

2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Jonata Augusto de Oliveira

**Farmacocinética do efavirenz em coelhos: estudo comparativo do
insumo farmacêutico ativo e dispersão sólida polimérica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Prof^a. Dr^a. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara-SP

2018

Ficha Catalográfica

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

O149f Oliveira, Jonata Augusto de
Farmacocinética do efavirenz em coelhos: estudo comparativo do insumo farmacêutico ativo e dispersão sólida polimérica / Jonata Augusto de Oliveira. – Araraquara, 2018.
119 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Rosângela Gonçalves Peccinini.

1. Efavirenz. 2. Dispersão sólida. 3. Farmacocinética. 4. SIDA. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Título.

Ficha Catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440.

CAPES: 40500005

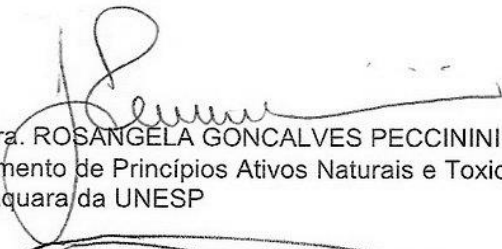
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: FARMACOCINÉTICA DO EFAVIRENZ EM COELHOS: ESTUDO COMPARATIVO DO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO E DE DISPERSÃO SÓLIDA POLIMÉRICA

AUTOR: JONATA AUGUSTO DE OLIVEIRA

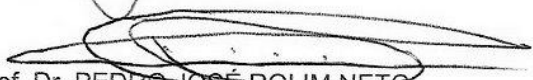
ORIENTADORA: ROSANGELA GONCALVES PECCININI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: SEM ÁREA DE CONHECIMENTO pela Comissão Examinadora:



Prof. Dra. ROSANGELA GONCALVES PECCININI

Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof. Dr. PEDRO JOSÉ ROLIM NETO

Departamento de Ciências Farmacêuticas / Universidade Federal de Pernambuco



Prof. Dr. ANTONIO JOSE DE ARAUJO AGUIAR

Departamento Cirurgia e Anestesia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia do Câmpus de Botucatu da UNESP

Araraquara, 08 de fevereiro de 2018

Dedico este trabalho aos meus pais, Israel e Ilcelena, por toda oportunidade que me deram de estudar.

AGRADECIMENTOS

Deus você é O CARA!

Se você estiver lendo esta página significa que eu consegui. E garanto que não foi fácil chegar até aqui, mas pela sorte e ajuda do Todo Poderoso, o caminho foi mais leve graças a pessoas maravilhosas que estiveram ao meu lado em toda essa jornada e é à elas que quero expressar meus mais sinceros sentimentos:

Minha imensa gratidão, meu amor, meu respeito aos meus pais – Israel e Ilcelena -, por sempre proporcionarem uma base na qual eu pude me sustentar para seguir meu caminho e buscar os meus sonhos. Se hoje posso realizar mais uma conquista na minha vida, devo isso a vocês.

À minha irmã, cunhado, sobrinho, avós, tios, tias, primos, primas e pessoas íntimas, pelo carinho.

Especialmente a minha companheira, meu pedacinho, pelo seu entusiasmo, paciência, amor e carinho em todos os momentos. Você é a primeira a me apoiar e acreditar nos meus sonhos, amo você Lilian.

À Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini, minha orientadora, amiga e exemplo, pela enorme colaboração e seus conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho e também de forma esporádica entre uma conversa e outra. Meus agradecimentos sinceros pelo seu tempo, sua capacidade e sua atenção. Quando “crescer”, eu quero ser como você, cheio de “Charme, elegância e sofisticação”.

Ao Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto e sua aluna Salvana Priscylla Manso Costa, pela colaboração neste trabalho, em especial para Salvana, me salvando nos momentos mais cruciais da elaboração da escrita.

Também agradecer ao generoso auxílio de incontáveis pessoas que compartilharam comigo seus conhecimentos em suas áreas específicas. A todos vocês, manifesto meu profundo apreço.

Aos meus amigos de infância que levo com grande carinho, muito obrigado por me divertirem com as coisas mais simples da vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado, muito obrigado.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus de Araraquara por fornecer toda a infra estrutura para a realização deste trabalho, obrigado.

Aos colaboradores do Laboratório de Toxicologia e Laboratório de Bioequivalência da FCFar: Maria, Valéria, Marcos, muito obrigado!

Aos professores por compartilhar seus conhecimentos na pós-graduação.

A você meu caro leitor que esse trabalho seja um grande caminho para o seu conhecimento.

E por último, mas com toda certeza não menos importante, aos meus amigos de laboratório que estiveram junto comigo fortalecendo os laços da amizade em cada dia-a-dia entre brigas, risadas e principalmente na ajuda da execução deste trabalho, vou levar cada um de vocês dentro da minha memória:

Taísa – Você me ajudou das inúmeras formas possíveis, com entusiasmo e grande energia (não a noite). Você é a irmã mais nova que não tenho! Minha eterna gratidão;

Evelin – Parceira de trabalho, só nós dois sabemos os caminhos percorridos para chegar nesse resultado;

Carol – Seu conhecimento e sua vontade de ensinar te irradia de forma maravilhosa, obrigado por sempre ajudar nas horas do desespero e pela sua persistência em ir ao centro;

Bruna – Com você a risada é certa! Grandes convulsões de risos tivemos juntos, sem contar no pão pizza;

Natália – Oxee! Eitaa! Uéé... bordões que agora fazem parte da minha vida;

Anira – Melhor pessoa do mundo;

Kelly – Sempre disposta a ajudar em qualquer assunto e momento;

Bere – Sua energia contagia! Vamos dar na cara da vida;

Martina – Suas histórias são as melhores do mundo, bora fazer um café da tarde com bolo;

Emiliana – Seu humor peculiar é sua marca registrada;

Michel – Seu conhecimento é reflexo do seu esforço, obrigado por sempre ajudar;

Marco – “Segura essa paixão aee”, muito obrigado;

Manuel – Nós sabemos o quanto a sua temporada no Brasil foi difícil, mas com toda certeza rendeu grandes histórias, muito obrigado por toda ajuda;

Elias – A tranquilidade que todos devem ter, obrigado pela ajuda.

“Viver no mundo sem tomar consciência do significado do mundo é
como vagar por uma imensa biblioteca sem tocar os livros”

Dan Brown

Com vocês, queridos, divido a alegria desta experiência...

RESUMO

O efavirenz (EFZ), fármaco de primeira escolha utilizado no tratamento da imunodeficiência adquirida, é um fármaco de Classe II segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica. A baixa solubilidade desta classe de fármacos tem significativo impacto na sua absorção enteral, resultando principalmente em biodisponibilidade errática, característica que pode contribuir para a variabilidade de resposta ao tratamento. Frente a esse problema, o Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM) da Universidade Federal de Pernambuco complexou o EFZ em dispersão sólida (DS) com o objetivo de aumentar sua solubilidade e melhorar suas características de absorção. Para avaliar os resultados dessa inovação, o estudo da disposição cinética na administração por diferentes vias e diferentes modelos animais é indicado. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar a farmacocinética pré-clínica do EFZ em coelhos albinos (machos; 2,8 kg; n=21) após administração intravenosa (2,7 mg/kg) e oral do insumo farmacêutico ativo (50 mg) e do EFZ carregado pela DS (50 mg – 10% EFZ). A quantificação de EFZ no plasma dos animais foi realizada através de método cromatográfico previamente validado e os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos utilizando cálculos farmacocinéticos para modelo monocompartimental. O grupo EFZ-IV mostrou-se diferente estatisticamente em todos os parâmetros farmacocinéticos em relação às duas administrações orais; e esses resultados são esperados pois na administração intravenosa não há processo de absorção. Para os grupos ORAL-IFA e ORAL-DS não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os parâmetros farmacocinéticos, porém, foi observada menor variabilidade intra-grupo nesses parâmetros para o grupo que recebeu a dispersão sólida. Os resultados obtidos para ORAL-IFA e ORAL-DS de Cl $29,76 \pm 73,33\%$ e $21,75 \pm 27,55\%$ mL/min/kg; V_d área $20,5 \pm 83,93\%$ e $11,6 \pm 70,18\%$ L/kg; $t_{1/2}$ $10 \pm 94,85\%$ e $6 \pm 57,99$ h; C_{max} $1,46 \pm 62,69\%$ e $1,66 \pm 48,20\%$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, mostram que o EFZ carregado pela DS contribui de forma positiva para diminuição da alta variabilidade das suas concentrações plasmáticas, fundamentando estudos futuros em outros modelos animais e posteriormente estudos clínicos, com o objetivo de implementá-lo na terapêutica.

Palavras-chave: Efavirenz. Dispersão sólida. Farmacocinética. SIDA.

ABSTRACT

Efavirenz (EFZ), the first-choice drug used to treat acquired immunodeficiency, is a Class II drug according to the Biopharmaceutical Classification System. The low solubility of this class of drugs has a significant impact on its enteral absorption, resulting mainly in erratic bioavailability, a characteristic that may contribute to the variability of response to treatment. Faced with this problem, the Laboratory of Medication Technology (LTM) of the Federal University of Pernambuco produced a new solid dispersion (DS) with the objective of increasing EFZ solubility and improving its absorption characteristics. To evaluate the results of this innovation, the kinetic arrangement in the administration by different routes and different animal models is indicated. The aim of the present study was to evaluate and compare the pre-clinical EFZ pharmacokinetics in albino rabbits (male, 2.8 kg, n = 21) after intravenous (2.7 mg/kg), oral active pharmaceutical ingredient (50 mg) and carried by DS (500 mg - 10% EFZ). EFZ quantification was performed using a previously validated chromatographic method and the pharmacokinetic parameters were obtained and compared to each other using pharmacokinetic calculations for one-compartmental models. The EFZ-IV group was statistically different in all pharmacokinetic parameters relative to the two oral administrations, these results are expected since intravenous administration does not undergo the absorption process, leading to the immediate occurrence of the distribution and elimination processes. For the ORAL-IFA and ORAL-DS groups, no statistically significant difference was observed either, but less intra-animal variability was observed in the pharmacokinetic parameters from administration carried out by solid dispersion. The results obtained for ORAL-IFA and ORAL-DS of Cl $29.76 \pm 73.33\%$ and $21.75 \pm 27.55\%$ mL/min/kg; $V_{d_{area}}$ $20.5 \pm 83.93\%$ and $11.6 \pm 70.18\%$ L/kg; $t_{1/2}$ $10 \pm 94.85\%$ and 6 ± 57.99 h; C_{max} $1.46 \pm 62.69\%$ and $1.66 \pm 48.20\%$ $\mu\text{g/mL}$, respectively, show that EFZ carried with DS contributes positively to decrease the high variability of its plasma concentrations, grounding future studies in other animal models and later clinical studies, with a view to its implementation in therapeutics.

Keywords: Efavirenz. Solid dispersion. Pharmacokinetics. AIDS.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μm – Micrometros
3TC – Lamivudina
ADME – Fenômenos farmacocinéticos: absorção, distribuição, metabolismo e excreção
AIDS - Acquired immunodeficiency syndrome
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARVs – Antirretrovirais
AS_{0-∞} – Área sob a curva de zero extrapolado ao infinito
ASC_{0-t} – Área sob a curva de zero ao último tempo quantificável
ASMC_{0-∞} – Área sob o momento da curva de zero extrapolado ao infinito
ASMC_{0-t} – Área sob o momento da curva de zero ao último tempo quantificável
CITV – Comitê Internacional de Taxonomia Viral
Cl – Clearance
Cl_h – Clearance hepático
Cl_r – Clearance renal
Cl_t – Clearance total
C_{max} – Concentração plasmática máxima
CQA – Controle de qualidade alto
CQB – Controle de qualidade baixo
CQD – Controle de qualidade diluído
CQM – Controle de qualidade alto
CTA – Centro de testagem e aconselhamento
DS – Dispersão sólida
DZP – Diazepam
ECCD – Estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento
ECD – Estabilidade de curta duração
EFZ – Efavirenz
EFZ-DS – Grupo experimental que recebeu efavirenz carregado pela dispersão sólida
EFZ-IFA – Grupo experimental que recebeu efavirenz na forma de insumo farmacêutico ativo
EFZ-IV – Grupo que recebeu efavirenz IV bolus
ELD – Estabilidade de longa duração
ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EMA – European medicines agency
EPP – Estabilidade pós-processamento
FDA – Food drug administration
F_{oral} – Biodisponibilidade absoluta
h – Hora
HAART – Highly active antiretroviral therapy
HIV-1 – Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HIV-2 – Vírus da imunodeficiência humana tipo 2
HPLC – High performance liquid chromatography
ICCR5 – Inibidor do receptor quimiocina 5
IF – Inibidores de fusão
IIn – Inibidores da integrase
IN – Integrase
INNTR – inibidores não-nucleosídeo da transcriptase reversa

INTR – inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa
IP – Inibidores da protease
 K_a – Constante de absorção
 K_b – K-bites
 K_{el} – Constante de eliminação
kg – Quilograma
L – Litros
LIQ – Limite inferior de quantificação
ln – logaritmo natural
LTM – Laboratório de Tecnologia de Medicamentos
LTR – Repetições de terminais longos
MAT – Tempo de absorção médio
min – Minutos
mm – Milímetros
MRT – Tempo de residência médio
MTT – Tempo de trânsito médio
nm – Nanômetros
OMS – Organização mundial da saúde
PI – Padrão interno
PR – Enzimas protease
PVP – Polivinilpirrolidona
 $R_{áreas}$ – Relação entre as áreas
SCB – Sistema de classificação biofarmacêutica
SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNC – Sistema nervoso central
SUS – Sistema único de saúde
 $T_{1/2}$ – Meia vida de eliminação
 $T_{1/2a}$ – Meia vida de absorção
TARV – Tratamento antirretroviral
TDF – Tenofovir
 T_{lag} – Tempo para o início da absorção
 T_{max} – Tempo necessário para atingir a concentração máxima
TR – Transcriptase reversa
UFPE – Universidade Federal de Pernambuco
UHPLC - Ultra-High Performance Liquid Chromatography
UNAIDS – Joint United Nations Program on HIV/AIDS
 V_c – Volume de distribuição central
 V_d – Volume de distribuição
 $V_{d\acute{a}rea}$ – Volume de distribuição de pseudo-equilíbrio
 V_{dss} – Volume de distribuição no estado de equilíbrio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vírus do HIV.....	21
Figura 2 – Genoma do HIV.....	22
Figura 3 – Ciclo de vida do HIV-1 e os estágios da replicação que os antirretrovirais atuam.....	24
Figura 4 – Epidemiologia global por população chave.....	26
Figura 5 – Progressos rumo às metas 90-90-90.....	27
Figura 6 – Possibilidades de combinações entre os ARVs na HAART.....	32
Figura 7 – Sistema de Classificação Biofarmacêutica – SCB.....	34
Figura 8 – Estrutura química do EFZ.....	35
Figura 9 – Representação esquemática dos modelos compartimentais, junto com seu perfil cinético considerando administração extravascular de um fármaco.....	46
Figura 10 – Esquema do processamento de amostra.....	59
Figura 11 – Grupos experimentais.....	65
Figura 12 – Orelha tricotomizada do coelho com identificação da artéria e veia auricular.....	65
Figura 13 – Aplicador de comprimido utilizado para administração em coelhos.....	66
Figura 14 – Cromatograma em 245 nm do EFZ (8µg/mL) e padrão interno (Diazepam 25µg/mL) em plasma (verde) e brando (vermelho).....	71
Figura 15 - Cromatograma em 245 nm do EFZ (8µg/mL) e padrão interno (Diazepam 25µg/mL) em plasma (verde); DZP (25 µg/mL) em plasma (azul) e brando (vermelho).....	72
Figura 16 – Curva bioanalítica construída para EFZ (n=3) em plasma.....	73
Figura 17 - Influência da absorção e eliminação no C _{max} e T _{max}	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mecanismos de ação e posologia dos ARVs.....	31
Tabela 2 – Classificação Biofarmacêutica dos ARVs utilizados na terapia do controle da AIDS no Brasil.....	35
Tabela 3 – Parâmetros farmacocinéticos avaliados.....	68
Tabela 4 – Média das concentrações experimentais que geraram a curva de calibração.....	73
Tabela 5 – Precisão e exatidão dos controles de qualidade para o método bioanalítico do EFZ em plasma.....	74
Tabela 6 – Ensaio da recuperação das três triplicatas do controle de qualidade.....	75
Tabela 7 – Estabilidade do EFZ sob condições de armazenamento e processamento em plasma.....	77
Tabela 8 – Valores das concentrações plasmáticas de EFZ <i>versus</i> tempo na administração de EFZ IV <i>bolus</i> em coelhos (n=7)	78
Tabela 9 - Parâmetros farmacocinéticos do EFZ a partir da administração IV bolus (n = 7, média ± IC95)	80
Tabela 10 - Valores das concentrações plasmáticas de EFZ <i>versus</i> tempo na administração de EFZ cápsulas em coelhos (n=6)	81
Tabela 11 - Parâmetros farmacocinéticos do EFZ a partir da administração Oral da cápsula (n = 6, média ± IC95)	83
Tabela 12 - Valores das concentrações plasmáticas de EFZ <i>versus</i> tempo na administração de cápsulas contendo EFZ carreado pela dispersão sólida (média, n=7)	84
Tabela 13 - Parâmetros farmacocinéticos do EFZ a partir da administração oral da cápsula contendo o fármaco carreador pela dispersão sólida (n = 7, média ± IC95)	86
Tabela 14 - Comparação estatística dos parâmetros farmacocinéticos do EFZ nas diferentes formulações (média + CV%).....	88

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Perfil farmacocinético do EFZ administrado por IV bolus (média \pm DP, n = 7)	79
Gráfico 2 - Perfil cinético do EFZ puro administrado por via oral (média \pm DP, n = 6).....	82
Gráfico 3 - Perfil cinético do EFZ carregado pela dispersão sólida administrado por via oral(média \pm DP, n = 7).....	85
Gráfico 4 - Perfil farmacocinético de todos os grupos IV; ORAL-PURO e ORAL-DS (média \pm DP, n = 21)	87

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1 História da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.....	20
2.2 O vírus	21
2.3 Organização genômica.....	22
2.4 Ciclo de vida do HIV-1	23
2.5 Classificação do vírus e sua variabilidade genética	25
2.6 Transmissão do HIV	25
2.7 Epidemiologia no Mundo e no Brasil	26
2.8 Sintomas e fases da AIDS.....	28
2.9 Diagnóstico	29
2.10 Tratamento.....	29
2.11 Sistema de Classificação Biofarmacêutica – SCB	33
2.12 Efavirenz	35
2.13 Estratégias para melhorar a solubilidade do efavirenz.....	38
2.14 Farmacocinética	40
2.14.1 Modelos farmacocinéticos.....	45
2.14.2 Modelos compartimentais	45
2.14.3 Farmacocinética pré-clínica no desenvolvimento de novos fármacos	47
2.15 Modelo animal	48
3 OBJETIVOS	55
3.1 Objetivo Geral	55
3.2 Objetivos Específicos	55
4 MATERIAL	56
4.1 Soluções padrão, solventes, reagentes e matriz biológica	56
4.2 Equipamentos	57
4.3 Softwares	57
5 MÉTODOS	58
5.1 Desenvolvimento do Método Bioanalítico	58
5.2 Preparo da Amostra	58
5.3 Validação do método bioanalítico	59
5.4 Protocolo Experimental	62
5.5 Animais	62
5.6 Delineamento experimental	63
5.7 Análise Farmacocinética	67
5.8 Análise Estatística	69
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
6.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico.....	70

6.2 Avaliação Farmacocinética.....	77
6.3 Comparação estatística e interpretação dos resultados	86
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	98
REFERÊNCIAS	99
APÊNDICES.....	115
ANEXO.....	119

1 INTRODUÇÃO

No início de 1981, algumas publicações de casos clínicos descrevendo a manifestação de doenças oportunistas, até então raras, em jovens saudáveis, foram consideradas o marco inicial da história da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS, em inglês) (CDC 1981; HYMES et al., 1981). Evidências sugerem que o Vírus da Imunodeficiência Humana – (HIV, em inglês) se originou de inúmeras adaptações genéticas de lentivírus que infectavam primatas africanos, acarretando característica e patogenicidades próprias, distintas do vírus ancestral (HEENEY, et al., 2006). Essa modificação facilitou a transmissão inter-humana que ocasionou a disseminação do agente para os cinco continentes, tornando-se uma pandemia incontrolável (MANN, 1989).

Após as publicações dos primeiros registros dos sintomas da AIDS, atualmente, estima-se que houve 2,4 milhões de novas infecções e 1,3 milhões de mortes somente no ano de 2016. Apenas o Brasil concentra 2,3% das novas infecções em relação ao restante do mundo (UNAIDS, 2016).

Durante os anos 90, a AIDS transformou-se de uma infecção fatal para uma condição crônica (SEPKOWITZ, 2001). Ainda assim, após mais de três décadas, o controle da pandemia está além dos serviços de saúde, representando um fenômeno global, dinâmico e instável, onde o comportamento individual e coletivo, dentre outros fatores, é a maior causa de ocorrência da doença em várias regiões do mundo (BRITO et al., 2000).

O HIV é transmitido através do contato com fluidos corporais de pessoas infectadas, onde as células alvo são todas as células que apresentam os receptores CD4 + (UNAIDS, 2016). Ligando-se a um componente da membrana celular - CD4 - o retrovírus se multiplica no interior da célula até ocorrer seu brotamento, e isso ocorre de maneira rápida e dinâmica, diminuindo a contagem dessas células, e tornando o indivíduo imunodeficiente expondo-o a patógenos oportunistas (BRASIL, 2015). A AIDS só se estabelece quando o HIV já destruiu o sistema imunológico do hospedeiro infectado (ABIA, 2017).

O diagnóstico da infecção é realizado gratuitamente nas redes públicas de saúde e consiste no Teste Elisa que busca anticorpos contra HIV no sangue do paciente e, se confirmado, o Teste Immunoblotting Western Blot é requerido como teste confirmatório (BRASIL, 2015).

O tratamento antirretroviral é distribuído pelo Ministério da Saúde através do Sistema Único de Saúde (SUS), desde 1996 no Brasil, sem nenhum custo para o paciente, e envolve a associação de diversos fármacos que possuem classes e mecanismos de ação variados. Esta terapia, de três ou mais fármacos combinados, é denominada Terapia Antirretroviral (TARV), que promove a supressão da carga viral, elevando a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes soropositivos (BRASIL, 2015; DAY, 2003). Porém o vírus não é erradicado, permanecendo oculto no genoma das células T de memória do hospedeiro sendo reativado com a interrupção do tratamento (RANG et al., 2007).

A escolha dos fármacos para o esquema antirretroviral se dá principalmente através das características do paciente, estágio da doença e sua resistência. Atualmente há seis classes de medicamentos antirretrovirais: inibidores nucleotídeos da transcriptase reversa (INTR), inibidores não-nucleosídeo da transcriptase reversa (INNTR), inibidor da protease (IP), inibidor da integrase (IIn), inibidor de fusão (IF) e inibidor do receptor quimiocina tipo 5 (ICCR5) (BRASIL, 2008; GARBIN et al., 2017).

Dentre os fármacos disponíveis para utilização na TARV, encontra-se o efavirenz (EFZ), considerado fármaco de primeira escolha por possuir elevada potência de supressão viral, eficácia em longo prazo e menor risco de efeitos adversos severos (BRASIL, 2015). Porém, é classificado como fármaco de classe II (baixa solubilidade, alta permeabilidade), segundo o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) (MADHAVI et al., 2011), o que acarreta problemas de absorção no trato gastrointestinal e, em consequência, resultando biodisponibilidade baixa para a sua ação terapêutica (SATHIGARI et al., 2009). Ressalte-se que fármacos que apresentam baixa biodisponibilidade oral, em geral, tendem a apresentar grande variabilidade interindividual nos níveis plasmáticos alcançados em decorrência da ampla diversidade de fatores que podem interferir no processo de absorção. A variabilidade nas concentrações plasmáticas tem consequências sobre o desfecho clínico do uso do medicamento, levando a uma diminuição da eficácia do tratamento.

Atualmente, existem várias abordagens na tecnologia farmacêutica para melhorar a dissolução de fármacos pouco solúveis (RUDNIC & SCHWARTZ, 2000), dentre elas está à dispersão sólida (DS), um sistema que proporciona ao fármaco, ou parte dele, encontrar-se no estado amorfo, que apresenta maior solubilidade (MEDEIROS, 2013).

Diante deste cenário, o Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), vem se empenhando nos estudos de formulações para o EFZ, o que resultou no desenvolvimento de uma dispersão sólida para melhorar o seu perfil de dissolução, com expectativas de aumento da biodisponibilidade oral com menor variabilidade (VIANA et al., 2006).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a disposição cinética do efavirenz carregado em dispersão sólida, que possui a principal característica de aumentar a dissolução do EFZ, e compara-lo ao perfil disposicional do insumo farmacêutico ativo isolado, que atualmente é utilizado nos comprimidos de EFZ comercial, em modelo animal, tendo em vista o aumento da solubilidade *in vitro* observada.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 História da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Os primeiros relatos de uma nova enfermidade que viria mudar o curso da história da humanidade, se tornando uma epidemia em escala global, surgiu na década de 80, caracterizada por uma imunodeficiência profunda, acarretando doenças e infecções oportunistas (COTRAN et al., 2000; BAZIN et al., 2014).

Ainda desconhecida, a AIDS foi reportada no primeiro semestre de 1981 por Gottlieb et al., que descreveu casos clínicos de pacientes jovens homossexuais nas principais cidades dos Estados Unidos e que apresentavam quadros de imunodeficiência associados à pneumonia por *Pneumocystis carinii*, formas severas de Sarcoma de Kaposi.

Até aquele momento não se sabia o que estava causando a imunodeficiência mas, em janeiro de 1983, o francês Françoise Sinoussi (Barré-Sinoussi), isolou um retrovírus que apresentava a enzima transcriptase reversa, a partir, do linfonodo de um jovem paciente homossexual com linfadenopatia generalizada progressiva (PGL), confirmando assim o agente agressor (STEINBROOK, 2002).

Por inúmeras vezes, as terminologias para o mesmo agente foram modificadas, até que em 1986 o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (CITV), recomendou a denominação *Vírus da Imunodeficiência Humana 1* (HIV-1) (COFFIN et al., 1986; WIGG et al., 2002).

No mesmo ano, outro retrovírus foi isolado de dois pacientes originários da África Ocidental identificados com AIDS, recebendo assim a denominação de *Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2* (HIV-2) (CLAVEL et al., 1986).

Por apresentar ampla distribuição geográfica o HIV-1, portanto, é responsável pela pandemia que assola o mundo, enquanto que, o HIV-2 parece ser restrito ao oeste Africano e poucas áreas da Ásia (WIGG et al., 2002).

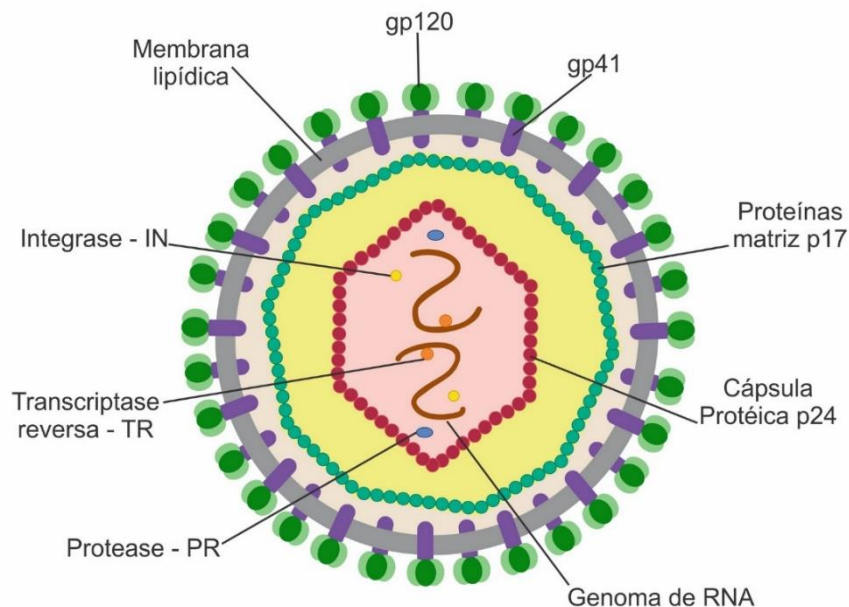
Desde então, incontáveis e intensos avanços tecnológicos abrangendo diversas áreas de pesquisa permitiram novas descobertas sobre o vírus da AIDS, possibilitando entender melhor a sua infecção e ciclo viral, encontrando assim meios para o controle da infecção. Dentre os fatores históricos de maior impacto está o aperfeiçoamento de testes laboratoriais mais precisos, a utilização de fármacos

antirretrovirais e a criação de políticas públicas que possibilitaram o acesso público ao diagnóstico e tratamento (BAZIN et al., 2014).

2.2 O vírus

Classificado como membro da família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirina* e gênero *Lentivirus*, o HIV-1 (figura 1) possui forma esférica e tamanho de aproximadamente 100 nm de diâmetro. Sua membrana é envolvida por uma camada lipídica proveniente da célula infectada que apresenta em sua superfície glicoproteínas (gp120), que são ancoradas no vírus por meio de interações com glicoproteínas transmembrana (gp41) (TURNER & SUMMERS, 1999). Proteínas adicionais coexistem na superfície do vírus que também são derivadas da célula hospedeira, como por exemplo, as do complexo principal de histocompatibilidade – CPH - exercendo papel fundamental para a infecção de novas células (COTRAN et al., 2000).

Figura 1: Vírus HIV-1.



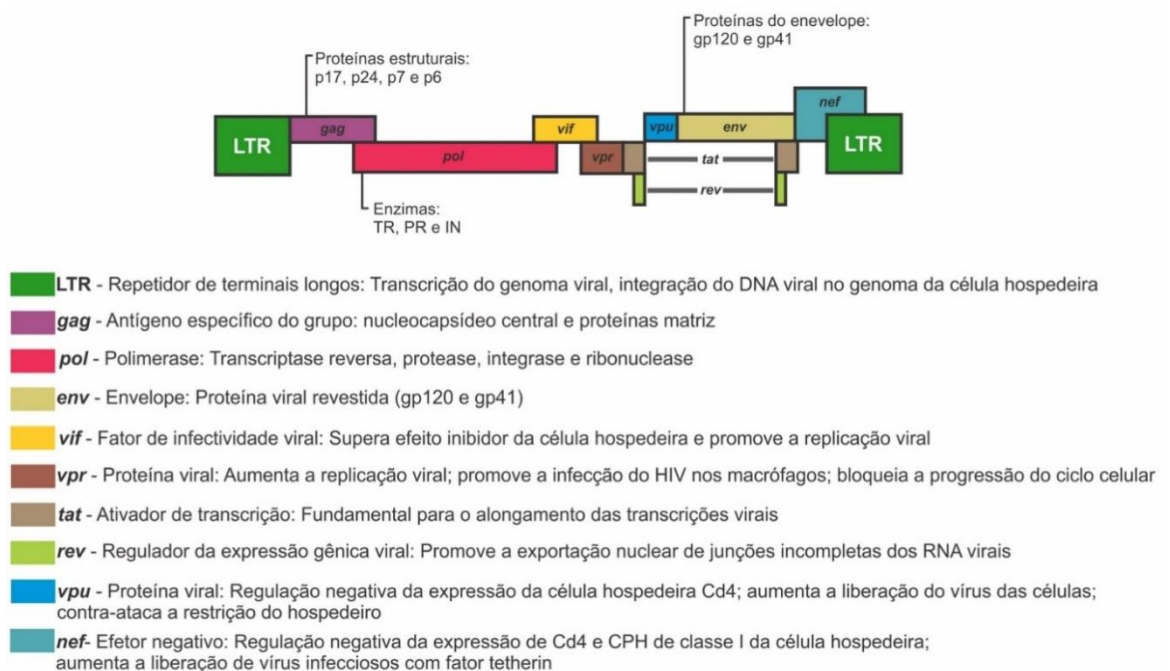
Fonte: Autoria própria

Mais internamente encontra-se a matriz estrutural que é formada por proteínas p17, o capsídeo é envolto pela proteína p24 e dentro desse último encontra-se: duas cópias em mono fitas do RNA, as enzimas protease (PR), transcriptase reversa (TR) e integrase (IN), que são de fundamental importância para os principais eventos da replicação (GROTTO; PARDINI, 2006).

2.3 Organização genômica

O genoma do HIV-1 possui, aproximadamente, 9,2 Kb de comprimento e é constituído por nove genes (figura 2) que possuem em suas extremidades regiões denominadas Repetições de Terminais Longos (LTR, em inglês), sendo responsáveis pelo controle e expressão genética viral, pela integração viral no genoma do hospedeiro e sua replicação (ABBAS, 2011).

Figura 2: Genoma do HIV-1.



Adaptado de RANG 2007.

Sua organização genômica apresenta três principais genes estruturais: *gag*, responsável pela codificação das proteínas estruturais do núcleo; *pol* (polimerase), que codifica as proteínas necessárias para a replicação viral: TR, IN e PR; e o *env*

(envelope), o qual é responsável pela produção das glicoproteínas da superfície viral *gp120* e *gp41*, que se associam de forma não covalente umas às outras permitindo o sucesso da infecção das células. Além desses, o HIV codifica ainda seis genes reguladores (*tat*, *vev*, *vpr*, *vpu*, *nef* e *vif*), cujos produtos possuem informações que regulam a reprodução de novas cópias do vírus (ABBAS, 2011).

2.4 Ciclo de vida do HIV-1

A fase inicial da replicação viral se inicia com a interação específica da glicoproteína *gp120* do vírus com a superfície dos receptores CD4, uma proteína encontrada nos linfócitos T e macrófagos do hospedeiro, de fundamental importância para a ligação, mas não suficiente para o sucesso da infecção (NAZARI; JOSHI, 2008).

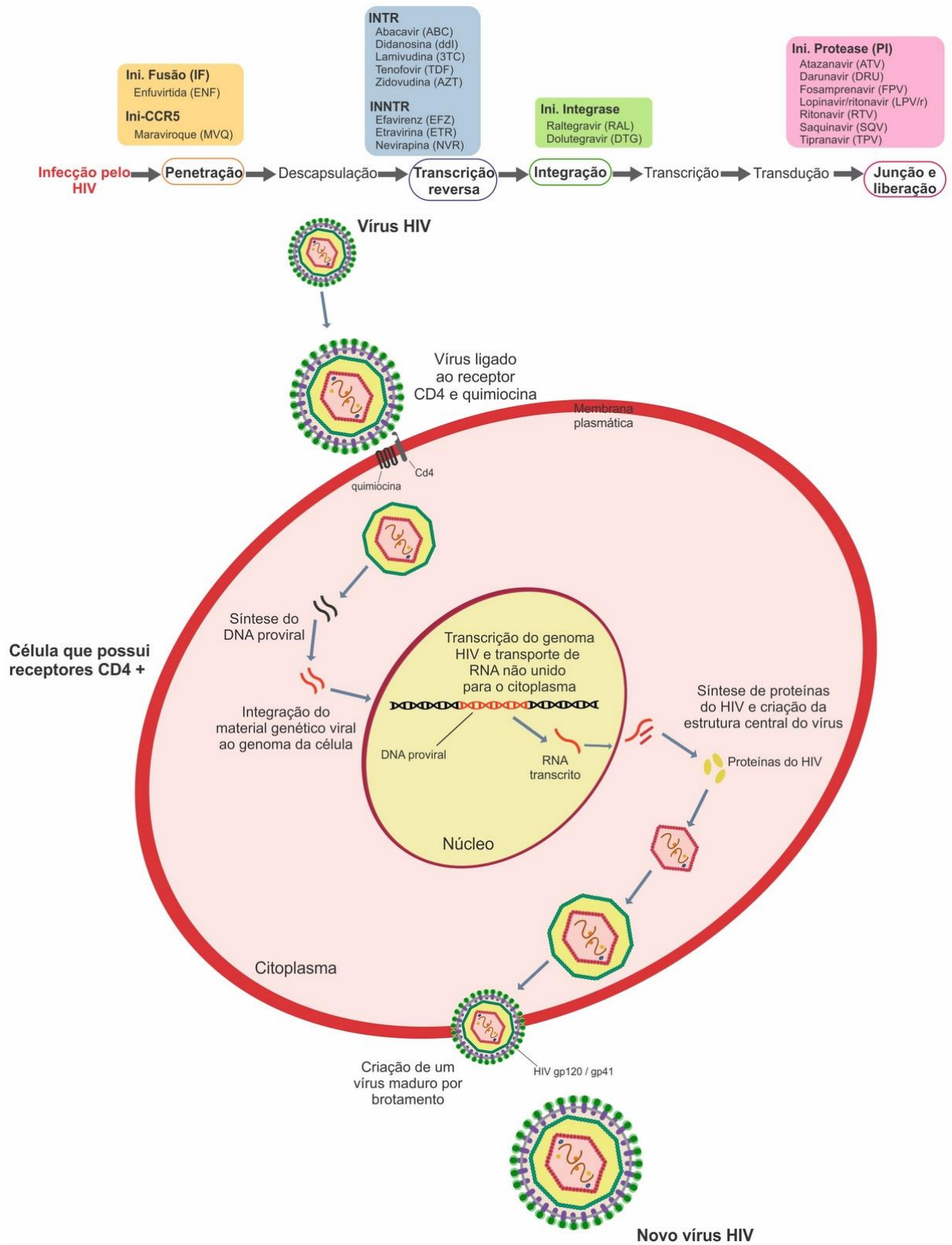
Necessitando de uma proteína superficial adicional para ocorrer a fusão entre o envelope viral e a membrana da célula infectada, a interação da *gp120* e das células do hospedeiro ocasiona mudanças em suas formas favorecendo a participação de co-receptores, tais como: CXCR4 e CCR5. Este favorecimento leva a modificação conformacional da molécula de *gp41*, que facilita a fusão do vírus na membrana celular (FREED, 2002).

Uma vez ocorrida a fusão, dá-se a inserção do capsídeo viral no citoplasma celular com liberação do genoma viral, composto pelo RNA e as enzimas necessárias para a replicação. Logo em seguida, o RNA viral é recodificado pela enzima transcriptase reversa, convertendo-a para DNA complementar ou DNA proviral, que futuramente é transportado para dentro do núcleo celular onde será integrado covalentemente ao genoma da célula infectada pela ação da enzima integrase. A integração é primordial para a replicação viral e persistência da infecção (CUNICO, et al., 2008; KLIMAS, et al., 2008).

A fase final é caracterizada pela ativação da transcrição do DNA em RNA mensageiro que logo em seguida é traduzido em proteínas virais. O fim da replicação e transcrição ocorre pela ação da enzima protease, que cliva a proteína viral precursora em proteínas individuais maduras. O RNA e as proteínas virais agrupam-se, ocorrendo a montagem do novo envelope viral e, posteriormente, o vírus é liberado da célula hospedeira por meio de brotamento, sofrendo maturação e

assim se tornando apto a infectar novas células (WIGG et al., 2002). O ciclo viral do HIV-1 está representado esquematicamente na Figura 3.

Figura 3: Ciclo de vida do HIV-1 e os estágios da replicação que os antirretrovirais atuam.



2.5 Classificação do vírus e sua variabilidade genética

No momento atual, dois tipos de HIV foram identificados, diferenciando-se pelas suas propriedades antigênicas, moleculares e biológicas, sendo eles: HIV-1 causador da pandemia global da AIDS e HIV-2 responsável apenas por epidemias de números reduzidos localizadas em países da África Ocidental, Ásia e Europa (KILMARX, 2009).

A diversidade mutagênica do HIV, caracterizada pela ausência de correção do DNA no processo de replicação viral pela TR, somada com a elevada taxa de replicação viral (aproximadamente 10 bilhões vírus/dia), resultam em variedades filogenéticas do vírus ao longo de sua replicação no hospedeiro (PINTO; STRUCHINER, 2006). Estudos mostraram que a transmissão do HIV-1 de primatas não humanos para o homem resultou em quatro linhagens filogenéticas diferentes: M (*major*), responsável por mais de 90% das infecções, O (*outlier*), N (*new* ou *non-M/non-O*) e P (*new-group*) (WOODMAN; WILLIAMSON, 2009; PLANTIER, et al., 2009).

Após a introdução do grupo M do HIV-1 nos seres humanos, o vírus sofreu grande evolução ramificando-se em nove subtipos nomeados: A-D, F-H, J e K, em que os subtipos A e F possuem sub-subtipos designados A1, A2 e F1 e F2, respectivamente. Além desse fato, outras 16 formas circulantes recombinantes (CRF) estão presentes na ramificação, sendo as mais comuns as CRF02_AG e CRF01_AE (PINTO; STRUCHINER, 2006).

Essa variedade filogenética resulta em diferentes recombinações genéticas entre os subtipos, sendo uma das principais razões da dificuldade de se desenvolver vacinas e fármacos para o tratamento antirretroviral (RAMBAUT, 2004).

2.6 Transmissão do HIV

A infecção pelo HIV-1 é caracterizada por dois tipos de transmissão: vertical e horizontal. A transmissão vertical se deve através da passagem do vírus HIV da mãe para o filho, durante o período da gestação (intrauterino), no parto ou pelo aleitamento materno. Já a transmissão horizontal se deve pela infecção no contato com fluídos corporais: sangue, fluído vaginal, sêmen; por via sexual (responsável pela grande maioria dos casos de contaminação em todo o mundo), parenteral,

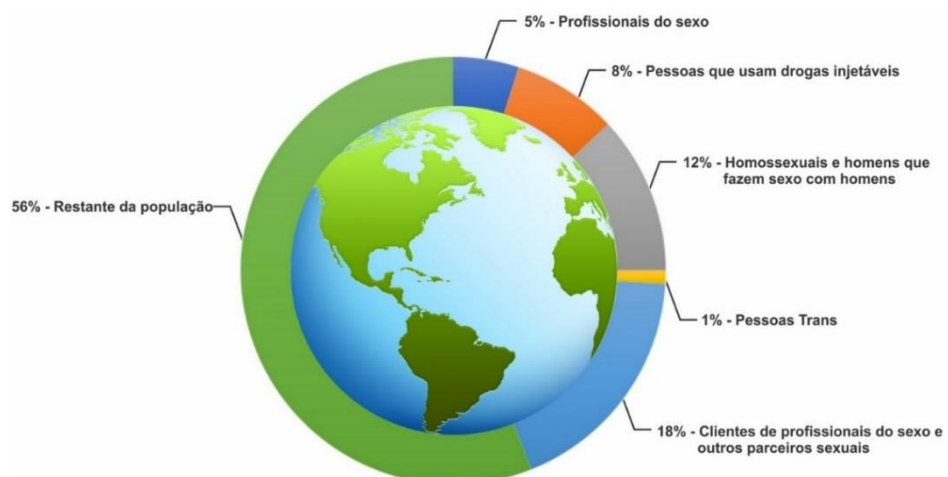
usuários de drogas endovenosas, compartilhamento de seringas ou agulhas contaminadas e utilização de hemoderivados contaminados (MANAVI, 2006; DAVIDSON et al., 2009; ABIA, 2017).

Atualmente não existem evidências plausíveis de transmissão da infecção pelo vírus HIV por: contato interpessoal não-sexual ou não-percutâneo, picadas de insetos, objetos inanimados (fômites), instalações sanitárias e fontes ambientais (BRASIL, 2015).

2.7 Epidemiologia no Mundo e no Brasil

Desde a descoberta do HIV, 36 anos se passaram; 35 milhões de pessoas morreram e 78 milhões foram infectadas. Atualmente o número de pessoas vivendo com HIV são de 36,7 milhões, distribuídas principalmente em populações-chave, onde se tem a maior concentração da epidemia: profissionais do sexo, pessoas que usam drogas injetáveis, homossexuais e homens que fazem sexo com homens, transexuais, clientes de profissionais do sexo e outros parceiros sexuais e restante da população (pessoas privadas de liberdade, crianças, indivíduos infectados por procedimento cirúrgico ou transfusão sanguínea, indivíduos que não se encaixam na descrição da população chave e etc.). Mundialmente em 2015, 25% das novas infecções pelo vírus ocorreu entre esses grupos, evidenciando a importância de alcançá-los com informações e serviços de saúde. Na figura a seguir a população-chave está representada pela sua respectiva parcela de infecção no contexto atual (UNAIDS, 2016).

Figura 4: Epidemiologia Global por população-chave.



Fonte: Dados epidemiológicos fornecidos pela UNAIDS 2016; Gráfico: Autoria própria.

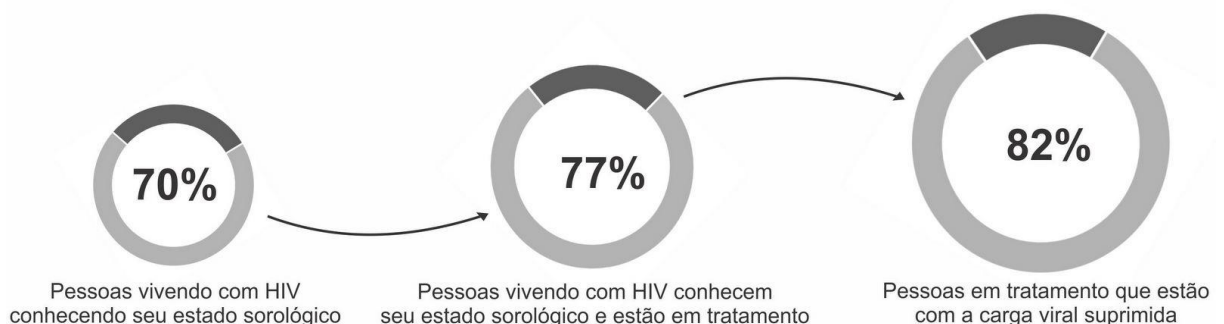
Em junho de 2017 a UNAIDS publicou as mais atualizadas informações sobre o HIV e a situação da AIDS no Brasil e concluiu que o país, por ser o mais populoso da América Latina, corresponde sozinho por mais de 49% das novas infecções de HIV. Nas análises dos relatórios globais a agência destaca que a incidência de novos casos aumentou 3% no Brasil, em tendência contrária ao que se registra na média mundial, que sofreu contração de 11% (UNAIDS, 2017).

Em termos gerais esse aumento é considerado pouco em vista dos números frente aos outros países, mas em entrevista pública o diretor-executivo da UNAIDS Michel Sidibé afirma que a situação é alarmante:

“O poder da prevenção não está sendo realizado. Se houver um aumento de novos casos de infecção agora, a epidemia será impossível de ser controlada. O mundo precisa tomar medidas urgentes e imediatas”. (Jornal O Dia, 2016).

Uma das medidas empregadas é alcançar as metas de tratamento 90-90-90, que foram iniciadas em 2014 com o objetivo de acelerar a evolução na resposta contra ao HIV, de forma que 90% de todas as pessoas que vivem com HIV conheçam seu estado sorológico e sejam diagnosticadas; 90% das pessoas tenham acesso ao tratamento antirretroviral e 90% das pessoas que fazem uso do tratamento, tenham carga viral indetectável (UNAIDS, 2016). Na figura 5 estão representadas as estatísticas do avanço das metas 90-90-90 no mundo.

Figura 5: Progressos rumo às metas 90-90-90.



Fonte: Dados epidemiológicos fornecidos pela UNAIDS 2016; Gráfico: Autoria própria.

2.8 Sintomas e fases da AIDS

A infecção primária ocorre quando o indivíduo acaba de se infectar com o vírus e o sistema imunológico começa a ser atacado. Essa fase pode ser comumente chamada de infecção aguda, sendo caracterizada como o período de incubação do HIV (viremia elevada e resposta imune intensa), ou seja, é o tempo de exposição ao vírus até o surgimento dos primeiros sinais da doença (BRASIL, 2017).

Esse estado acomete cerca de 50 a 90% dos pacientes, variando de três a seis semanas para o sistema imunológico produzir anticorpos anti-HIV. Essa cascata de eventos faz com que os primeiros sintomas que são manifestados sejam muito parecidos com os de uma gripe, como febre e mal-estar (WHO, 2009; BRASIL, 2017).

A fase seguinte é conhecida como latência clínica ou assintomática, é o período que ocorre forte interação entre as células de defesa e as ininterruptas e rápidas mutações do HIV. Mesmo o sistema imunológico sofrendo grande ataque viral, isso não o enfraquece o suficiente para permitir novas doenças, em razão dos vírus amadurecerem e morrerem de forma equilibrada (WHO, 2009; BRASIL, 2017).

Com o recorrente ataque, as células de defesa começam a perder a sua eficiência, caracterizadas pela alta redução dos linfócitos T CD4+, que chegam a ficar abaixo de 200 células por mm³ de sangue (em adultos saudáveis, esse valor varia entre 800 a 1.200 células). Como consequência desse evento, o organismo fica cada vez mais fraco e vulnerável a infecções, apresentando sintomas inespecíficos e de intensidade variável, como: sudorese noturna, fadiga, febre, emagrecimento, diarreia, trombocitopenia e candidíase (BRASIL, 2017).

Com a queda abrupta do sistema imune, começam a se instalar as doenças oportunistas, que recebem esse nome por se aproveitarem do comprometimento imunitário do hospedeiro. Essa fase determina o estágio mais avançado da doença, a AIDS. O indivíduo que chega nesse estágio da síndrome sem orientação e tratamento adequado pode apresentar comorbidades tais como: hepatites virais, tuberculose, pneumonia, toxoplasmose e alguns tipos de câncer (WHO, 2009; BRASIL, 2017).

2.9 Diagnóstico

O diagnóstico precoce possibilita o aumento da expectativa e a qualidade de vida do indivíduo infectado. Atualmente existem vários testes para o diagnóstico da infecção pelo HIV, com características distintas, que são direcionados pela busca de evidências do vírus em diferentes fases da infecção (BRASIL, 2017).

Os testes mais sensíveis para a detecção são os que se baseiam na busca pela presença do material genético do HIV no sangue ou no tecido do indivíduo, e são indicados principalmente para infecções recentes. Esses testes destinam-se a detecção do antígeno p-24 (componente da cápsula viral) e do RNA viral no plasma do paciente (WHO, 2009; BRASIL, 2017).

Os testes mais empregados na clínica para a detecção do vírus nas demais fases da infecção visam a busca específica de anticorpos para o HIV em amostras de sangue ou fluido oral, sendo eles: testes rápidos (imunoaglutinação), enzima-imunoensaio (ELISA) (teste inicial), o Western Blot (teste confirmatório), imunocromatografia e imunofluorescências indireta (teste confirmatório específicos) (WHO, 2009; BRASIL, 2017).

Em todos os casos a infecção pode ser detectada, pelo menos, 30 dias a contar da situação de risco, sendo esse período muito importante, pois é onde ocorre a chamada janela imunológica (BRASIL, 2017).

Todos os testes são realizados de forma gratuita, desde 1996, pelo Sistema Único de Saúde (SUS), nas unidades da rede pública e nos Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA). Os exames são realizados de forma sigilosa e anônima, e o resultado, se confirmado, dá início ao processo de aconselhamento e direcionamento do indivíduo em busca do tratamento mais adequado para a sua situação (BRASIL, 2017).

2.10 Tratamento

Nas últimas décadas, o retrovírus HIV passou de um agente terapeuticamente intratável para controlável, graças a disponibilidade de medicamentos antirretrovirais (ARVs) aprovados pelo FDA. O tratamento adequado para as características de cada paciente juntos com o uso correto e frequente da medicação, resulta na

supressão viral na corrente sanguínea para níveis indetectáveis, evitando o enfraquecimento do sistema imunológico, promovendo melhor qualidade de vida e sobrevida para pacientes que fazem o seu uso (OARAC, 2011).

Os ARVs começaram a surgir na década de 80, logo após a descoberta que o HIV era o agente etiológico da AIDS (BARRE-SINOUSI et al., 1983; GALLO et al., 1983), e neste momento já se encontram mais de 20 fármacos distribuídos em 6 diferentes classes terapêuticas: inibidores nucleotídeos da transcriptase reversa (INTR), inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa (INNTR), inibidor da protease (IP), inibidor da integrase (IIn), inibidor de fusão (IF) e inibidor do CCR5 (ICCR5) (BÉTHUNE, 2010; BRODER, 2010). Essa diversidade de medicamentos possibilita a atuação em diferentes fases da replicação do HIV, limitando ou impedindo a entrada do vírus na célula hospedeira, interferindo na multiplicação e liberação de novos vírions (REN et al., 2006)

Na tabela a seguir estão descritos os mecanismos de ação dos ARVs, mencionados por Zdanowicz, (2006) e Marcelin et al., (2009) junto com os antirretrovirais que se enquadram em cada classe farmacêutica e sua posologia.

Tabela 1: Mecanismos de ação e posologia dos ARVs. Fonte: BRASIL, 2015.

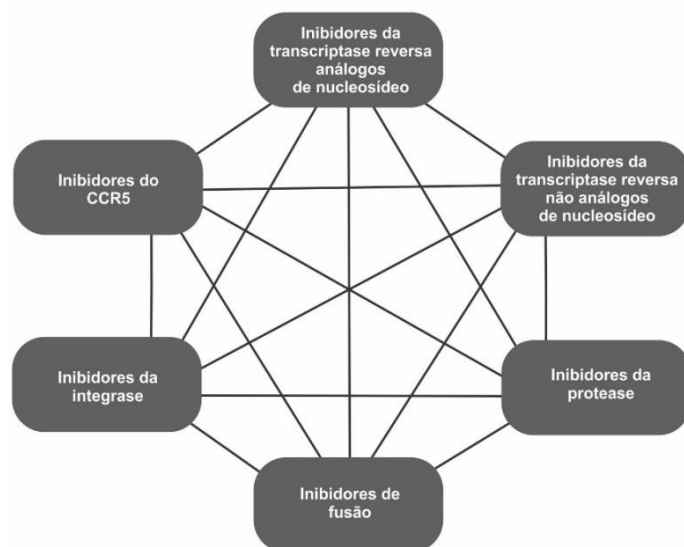
Classe terapêutica	Mecanismo de ação	Antirretrovirais	Posologia (comprimidos)
Inibidores nucleotídeos da transcriptase reversa (INTR)	Atua na enzima transcriptase reversa, ligando-se na cadeia de DNA durante sua síntese que foi sintetizada pelo vírus, acarretando mudanças estruturais na molécula de DNA, tornando-a defeituosa, o que leva a impossibilidade da replicação viral	Abacavir (ABC)	300 mg – 12/12h ou 600 mg – 1x/dia
		Didanosina (ddl)	<60 kg 250 mg; ≥60 kg 400 mg – 1x/dia
		Estavadina (d4T)	≥60Kg 40 mg 12/12h <60 Kg 30 mg 12/12h
		Lamivudina (3TC)	150 mg – 12/12h ou 300 mg – 1x/dia
		Tenofovir (TDF)	300 mg – 1x/dia
		Zidovudina + Lamivudina (AZT – 3TC)	1 comprimido combinado – 12/12h
Inibidores não-nucleotídeo da transcriptase reversa (INTR)	Age na enzima transcriptase reversa, porém eles agem diretamente na enzima, impedindo-a de realizar a função de replicação viral e consequentemente impossibilitando a multiplicação do vírus	Zidovudina (AZT)	300 mg – 12/12h
		Efavirenz (EFZ)	600 mg – 1x/dia
		Etravirina (ETR)	200 mg – 2x/dia
Inibidor da protease (IP)	Atua ligando ao sítio catalítico da enzima protease, impedindo-a de exercer sua função, entretanto essa ligação não impede a formação e liberação de novos vírions que serão imaturos e não infecciosos.	Nevirapina (NVP)	200 mg – 12/12h
		Atazanavir (ATV)	300 mg 1x/dia (se associado com RTV) ou 400 mg – 1x/dia
		Darunavir (DRV/r)	600 mg – 12/12h
		Fosamprenavir (FPV)	700 mg – 2x/dia
		Lopinavir/ritonavir (LPV/r)	2 comprimidos associados – 12/12h
		Ritonavir (RTV)	100 mg/dia (Sempre associado a outro IP)
Inibidor da integrase (IIn)	Bloqueia a ação da enzima integrase, impossibilitando a integração cromossômica entre a dupla fita de DNA viral recém sintetizada com a do DNA genômico da célula infectada, impedindo a replicação do vírus	Saquinavir (SQV)	1.000 mg – 2x/dia
		Tipranavir (TPV)	500 mg – 2x/dia
		Raltegravir (RAL)	400 mg – 12/12h
Inibidor de fusão (IF)	Age bloqueando a fusão e a entrada do vírus na célula hospedeira, por impossibilitar que haja mudanças conformacionais na gp41 do vírus HIV.	Dolutegravir (DTG)	600 mg – 24/24h
		Enfuvirtida (ENF) (T-20)	1 ampola 12/12h (SC)
Inibidor do CCR5 (ICCR5)	Atua impedindo a interação dos receptores CCR5 presentes na superfície das células hospedeiras com as moléculas gp120 do HIV, bloqueando a infecção.	Maraviroque (MVQ)	Com IP, exceto TPV/r, 150 mg – 12/12h; Com EFZ ou ETR, sem IP, 600 mg – 12/12h; Com DRV/r + ETR ou EFZ + IP/r (exceto TPV/r) 150 mg – 12/12h; TPV/r ou NVP, TDF, Biovir, RAL, sem IP, 300 mg – 12/12h

Com a disponibilidade de diferentes fármacos atuando em estágios distintos da replicação viral, foi possível criar a Terapia Antiretroviral de Elevada Potência (Highly Active Antiretroviral Therapy – HAART), sua introdução na clínica implicou grande avanço na prática terapêutica de portadores do HIV, sendo capaz de suprimir a replicação viral na maioria dos pacientes que fazem o seu uso (TOZZI, 2010).

Segundo De Clercq (2009) é grande o número de possibilidades de combinações entre os ARVs na HAART descrito na figura 6, que possui como objetivos principais:

- Obtenção de sinergismo entre as diferentes classes terapêuticas, com seus diferentes alvos no ciclo de replicação viral;
- Diminuição das doses em relação às monoterapias com diminuição dos efeitos colaterais;
- Diminuição da probabilidade do aparecimento de mecanismos de resistência viral.

Figura 6: Possibilidades de combinações entre os ARVs na HAART.



Fonte: Adaptado DE CLERQ, 2009.

Desde 1996, o Brasil distribui gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) o “coquetel *antiaids*” para todos que necessitam do tratamento. Segundo protocolos clínicos publicados pelo Ministério da Saúde, é necessário utilizar uma

combinação de pelo menos três antirretrovirais, sendo dois INTR associados a um INNTR, seguindo a regra, o esquema da primeira linha deve ser:

Tenofovir (TDF) + Lamivudina (3TC) + Efavirenz (EFZ)

O tratamento de primeira escolha é indicado na maioria dos casos de infecção pelo vírus, mas pode ser modificado avaliando o estágio em que se encontra o portador da síndrome. A alteração da terapia necessita de acompanhamento médico para avaliar novas adaptações do tratamento no organismo dos pacientes, como efeitos adversos e as possíveis dificuldades em seguir corretamente as recomendações médicas, para assim ter o sucesso terapêutico (BRASIL, 2015).

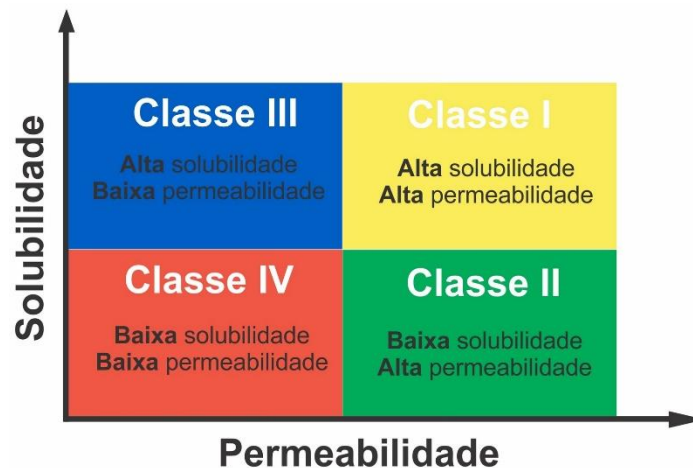
Os efeitos adversos gerados pelo HAART nem sempre compensam os ganhos com a terapia, levando muitos indivíduos a desistirem do tratamento, promovendo resistência viral pelo fato do HIV sofrer alta mutação na presença de concentrações fora da faixa terapêutica (BENNETT et al., 2008). Os efeitos adversos mais comuns dos ARVs são: vômitos, diarreias, náuseas, dores abdominais, cefaleia e até mesmo alterações na coloração da pele, e estão intimamente ligadas com a necessidade de frequentes administrações e altas doses dos fármacos, a fim de alcançar o efeito terapêutico desejado. As altas doses são referentes às inadequadas propriedades físico-químicas e baixa biodisponibilidade dos ARVs que levam a concentrações ínfimas do fármaco no local de ação (MELO; BRUNI; FERREIRA, 2006; PIERI; LAURENTI, 2012).

2.11 Sistema de Classificação Biofarmacêutica – SCB

Recentemente um novo padrão, aplicável a números consideráveis de medicamentos, foi desenvolvido baseado na classificação de fármacos de acordo com suas propriedades biofarmacêuticas (TAKAGI et al., 2006).

O conceito criado por Amidon et al., (1995) chamado de Sistema de Classificação Biofarmacêutica diferencia os fármacos em quatro diferentes classes, levando em consideração os parâmetros de solubilidade e permeabilidade intestinal em dois diferentes níveis: alto e baixo, descrito na figura 7.

Figura 7: Sistema de Classificação Biofarmacêutica – SCB.



Fonte: Adaptado de BENET, 2013

Existem diversas maneiras de se conduzir os estudos de solubilidade e permeabilidade, porém a avaliação da solubilidade é padronizada por metodologia descrita no guia do FDA (2000) ao contrário da avaliação da permeabilidade que, até o momento, não possui consenso quanto à sua padronização.

O principal objetivo do SCB é utilizar as informações dos estudos e fazer uma correlação entre os resultados de dissolução *in vitro* de fármaco e os resultados de biodisponibilidade *in vivo* (CAMPOS, 2008) que auxiliaram na decisão sobre a isenção de estudos de biodisponibilidade (bioisenção) para registro de medicamentos. Agências regulatórias, como o *Food Drug Administration* (FDA), *European Medicines Agency* (EMA) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) admitem a bioisenção para fármacos que se apresentam como Classe I, porém, a OMS amplia a bioisenção para alguns fármacos de Classe II (os que apresentam propriedades ácidas fracas) e para os de classe III (KAWABATA et al., 2011).

Os fármacos de classe II que compõem a maioria dos ARVs (Tabela 2) como o efavirenz, apresentam baixa solubilidade, e esta característica tem consequências sobre a absorção enteral, levando à grande variabilidade e baixa efetividade do processo. Modificações na formulação, para esta classe de ativos, apresentam boa correlação com o perfil *in vivo*, e isto significa que ao propor medidas para alterar a solubilidade do ativo há expectativas de melhorar o perfil de absorção.

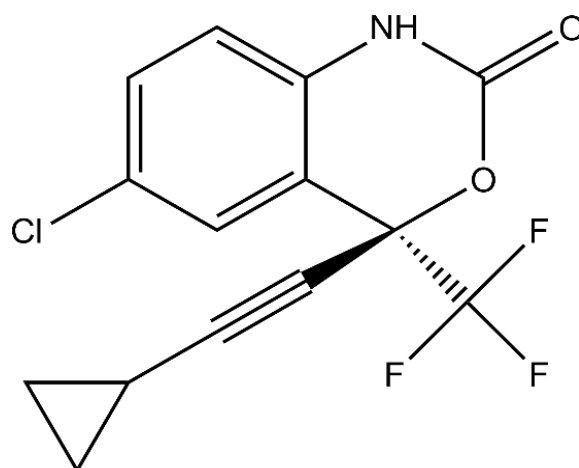
Tabela 2: Classificação Biofarmacêutica dos ARVs utilizados na terapia do controle da AIDS no Brasil (BASTIAANS, et al., 2014).

SCB	ARVs
Classe I	Enfuvirtida (ENF), Estavudina (d4t) e Zidovudina (AZT)
Classe II	Atazanavir (ATV), Darunavir (DRV), Efavirenz (EFZ) , Fosamprenavir (FPV), Lopinavir (LPV), Nevirapina (NVP), Raltegravir (RAL), Ritonavir (RTV) e Tipranavir (TPV)
Classe III	Abacavir (ABC), Didanosina (ddI), Lamivudina (3TC), Maraviroque (MQV) e Tenofovir (TDF)
Classe IV	Etravirine (ETR) e Saquinavir (SQV)

2.12 Efavirenz

Dentre os fármacos utilizados na HARRT, o efavirenz (figura 8) é considerado fármaco de primeira escolha nos principais protocolos terapêuticos para tratamento do HIV, por possuir elevada potência de supressão viral e menor risco de efeitos adversos sérios. Este está inserido na classe terapêutica dos INNTR e pode ser utilizado por adultos e adolescentes (sendo necessário ajuste de dose), exceto para gestantes e crianças menores de 3 anos (MADHAVI et al., 2011; BRASIL, 2015).

Figura 8: Estrutura química do efavirenz (EFZ).



Fonte: Autoria própria.

Desenvolvido por pesquisadores da *DuPont Merk Pharmaceutical Company*[®] o EFZ possui aparência de pó cristalino branco ou levemente amarelado, com massa molecular de 315,68, pKa de 10,2 e Log P de 5,4. Apresenta solubilidade em metanol e diclorometano, porém é praticamente insolúvel em água, o que acarreta a sua baixa e variável biodisponibilidade oral. Devido a essa característica é considerado fármaco de Classe II, segundo SCB (DRUGBANK, 2017; SHANKAR; CHOWDARY, 2013).

O EFZ possui atividade antiviral agindo como inibidor não competitivo, ligando-se diretamente à transcriptase reversa do vírus e inibindo o RNA viral e a atividade do DNA polimerase dependente, que por sua vez, interfere na transcrição do RNA viral em DNA viral, fundamental para a formação de novos vírions (PEÇANHA et al., 2002; MAGGIOLO, 2009).

No Brasil o EFZ encontra-se registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nas seguintes apresentações farmacêuticas: solução oral de 30 mg/mL, cápsulas gelatinosas duras de 50 e 200 mg e comprimidos revestidos de 300 e 600 mg (BRASIL, 2015). A dose recomendada para adultos é de 600 mg uma vez ao dia, porém em pacientes com idade entre três e dezessete anos, a dose dependerá do peso corpóreo (RIBERA et al., 2011).

Os efeitos adversos concentrações dependentes do EFZ incluem cefaleia, aumento dos níveis de colesterol e transaminases hepáticas, porém, os mais relevantes são observados no Sistema Nervoso Central (SNC). Segundo Mouly et al., (2002) os efeitos adversos geralmente surgem a partir da primeira dose e podem persistir por várias horas; esses efeitos geralmente tornam-se mais toleráveis e regredem no decorrer das primeiras quatro semanas de tratamento. Dos pacientes que fazem uso do medicamento, 53% relatam efeitos adversos sobre o SNC ou psiquiátricos. Comprometimento da concentração, disforia, tontura, sonhos vívidos ou anormais, insônia e alguns episódios de transtornos psiquiátricos (depressão grave, alucinação, pensamentos suicidas, tentativa de suicídio, comportamento agressivo e manias) são frequentemente relatados pelos pacientes (ADKINS; NOBLE, 1998; TESTA et al., 2007).

Após administração oral de 600 mg em pacientes infectados, a concentração plasmática máxima (C_{max}) é de $4,07 \pm 1,07$ µg/mL atingida em 3 – 5 h. A concentração mínima (C_{min}) é de $1,77 \pm 1,00$ µg/mL e sua área sob a curva (ASC) de $58,05 \pm 23,03$ µg/mL.h, evidenciando a variabilidade que pode ser encontrada em

diferentes indivíduos que fazem o seu uso. O estado de equilíbrio do EFZ é alcançado em torno de 6 - 10 dias (RIBERA et al., 2011).

Este fármaco é metabolizado no tecido hepático por enzimas da família do citocromo P450 (CYP3A4 e 2B6) sendo considerado forte indutor da CYP3A4, o que contribui para a metabolização rápida e consequentemente concentrações plasmáticas reduzidas de substratos desta isoenzima como: anticoncepcionais orais, estatinas, claritromicina, itraconazol, cetoconazol, etc. quando administrados concomitantemente com o EFZ. Sua farmacocinética é caracterizada por apresentar elevada meia-vida plasmática, entre 52 a 76 h após administração de doses únicas e 40 a 55 h após a administração de doses múltiplas, devido à autoindução do metabolismo (RIBERA et al., 2011). Testes realizados em indivíduos portadores do HIV mostraram que a janela terapêutica do fármaco é de 1 µg/mL (concentração mínima eficaz) a 4 µg/mL (concentração máxima tolerada) (MARZOLINI et al., 2001; TSUCHIVA et al., 2004).

Segundo estudos de Chiappetta et al., (2011) o EFZ demonstra farmacocinética não-linear com prolongada fase de absorção, que se atribui à saturação do metabolismo e diferenças na velocidade do esvaziamento gástrico. Ainda, é um fármaco que apresenta problemas na sua solubilização interferindo significativamente na sua absorção no trato gastrointestinal. A cinética não linear associada à baixa solubilidade do fármaco resultam em biodisponibilidade errática, característica que pode contribuir para a variabilidade de resposta ao tratamento.

Consequência do seu problema de solubilidade que reflete na sua absorção, o EFZ apresenta biodisponibilidade oral de 40 a 45% (Fabbiani et al., 2009; Friedland et al., 2006) com variabilidade inter e intraindividual de 54,6% e 26% respectivamente (CSAJKA et al., 2003). Frente à alta variabilidade, é recomendada a monitorização dos níveis plasmáticos de EFZ com a finalidade de evitar efeitos adversos e descontinuação do tratamento (CHIAPPETTA et al., 2011).

O aumento da absorção do EFZ foi observado no estudo de 24 indivíduos saudáveis que receberam 600 mg de EFZ concomitante com uma alimentação hiperlipídica (894 Kcal) e hipolipídica (440 Kcal), resultando no incremento em 39% e 51% na C_{max} e em 22% e 17% na ASC_{0-∞}, respectivamente (KAUL et al., 2010). O aumento na sua absorção resulta em concentrações plasmáticas maiores do que o esperado e, consequentemente, o aumento da frequência das reações adversas.

Desta forma, recomenda-se que a administração do antirretroviral seja em jejum, preferencialmente ao deitar (FDA, 2013).

Csajka et al., (2003) descrevem que o EFZ possui alta taxa de ligação as proteínas humanas (99,5 a 99,75%), predominantemente à albumina, e sua capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica, atingindo o líquido cefalorraquidiano com concentrações em média de 0,69% da concentração plasmática correspondente.

O estudo de Csajka et al., (2003) avaliou 235 pacientes (18-75 anos) infectados pelo vírus HIV durante 28 meses e que faziam uso de 600 mg oral de efavirenz uma vez ao dia, do qual obtiveram como resultado: volume de distribuição (Vd) aparente de 252 L, e *clearance* (Cl) de 9,4 L/h (8,7 a 10,3 L/h). Estudos mostraram que houve diferença significativa relacionando a farmacocinética do EFZ entre os sexos, sendo que o feminino apresentou menor valor de Cl em relação ao sexo masculino (9,08 L/h vs 10,2 L/h) (OFOTOKUN, 2007). Os estudos realizados não mostram efeito de primeira passagem significativo (GAO et al., 2007).

2.13 Estratégias para melhorar a solubilidade do efavirenz

Atualmente a tecnologia farmacêutica, frente aos problemas de absorção de fármacos Classe II, oferece diversas abordagens para melhorar sua taxa de dissolução, tendo como princípio básico a incorporação de matrizes poliméricas que são solúveis em água e que atuam para aumentar a área superficial, a solubilidade e/ou molhabilidade de partículas de pó (RUDNIC; SCHWARTZ, 2000). Essas modificações físicas são focadas na redução do tamanho de partícula ou geração de estados amorfos que contribuem para a solubilidade (VOGT; KUNATH; DRESSMAN, 2008).

Frente a essas modificações, a dispersão sólida (DS), é amplamente empregada para o melhoramento da solubilidade como sendo uma matriz ou carreadora junto a fármacos hidrofóbicos (SHARMA, 2011). As DS são sistemas que permitem que o fármaco, ou que parte dele, se mantenha no estado amorfo, que apresenta maior solubilidade e totalmente disperso no carreador, o que dificulta a junção das moléculas do fármaco (não permitindo a sua cristalização) por tempo suficiente para ser dissolvido no meio biológico (MEDEIROS, 2013).

A formação de DS está ligada intimamente com o melhoramento do desempenho do fármaco baseado na redução do tamanho de partículas ao nível molecular, proporcionando melhor molhabilidade, dispersabilidade e a formação de estruturas amorfas do fármaco no carreador. Esse sistema também é empregado para aumentar a estabilidade química de fármacos em solução ou suspensão, preparo de formas farmacêuticas de liberação controlada, redução de efeitos adversos e supressão de sabores desagradáveis (SHARMA, 2011).

O emprego de polímeros polivinilpirrolidona (PVP) para a redução de cristalinidade em fármacos de classe II em dispersão sólida foi estudado por inúmeros pesquisadores: MADHAVI et al., 2011; SRINARONG et al., 2010; YANG, 2010; ALVES, 2010, entre outros, tendo sempre como resultados a redução da cristalinidade do fármaco nas DS, melhorando assim os perfis de dissolução dos mesmos.

Estudos evidenciam que o vinilpirrolidona com copolímero de acetato de vinilo (PVPVA 64) pode melhorar significativamente a solubilização de compostos que são hidrocópicos. Esse composto é um copolímero que apresenta a combinação de cadeias de PVP (polivinilpirrolidona) e PVAc (acetado de polivinila) nas proporções 6:4, respectivamente. Por apresentar esta cadeia de PVAc, há maior propensão para realização de ligações de hidrogênio, além de apresentar menor higroscopicidade comparado ao PVP somente (PAUDEL et al., 2012). Segundo Albers e colaboradores (2009) a presença de água tem uma influência negativa na estabilidade das DS, já que a mesma diminui a transição vítrea (temperatura que separa o comportamento sólido do líquido) do sistema e, assim, facilita a recristalização. Devido à presença destas características, o PVPVA 64, teoricamente, possibilitaria melhores resultados quando comparados a outros PVPs, desta forma, foi considerado um forte candidato na produção de DS.

Diante desse cenário, Costa (2016) avaliou a aplicação do copolímero PVPVA 64 em dispersão sólida carreado de diferentes concentrações de efavirenz e, após caracterização físico-química através de técnicas calorimétricas, microscópicas e espectrofotométricas, constatou que a DS que apresentou maiores valores de dissolução *in vitro*, melhores níveis de saturação e conversão do EFZ para o seu estado amorfo foi o PVPVA 64 complexado com 10% de EFZ.

A obtenção da complexação do EFZ ao PVPVA 64 se deu através do método do solvente, da seguinte forma: O EFZ e os polímeros (polivinilpirrolidona + acetato

de polivinila), nas devidas proporções, foram separadamente dissolvidos, sendo utilizado 2 mL de acetonitrila + 10 mL de metanol para a solubilização do EFZ e 10 mL de metanol para a solubilização dos carreadores. A solução contendo EFZ foi vertida na solução contendo os polímeros e posteriormente a mistura foi mantida durante 15 min no ultrassom. A solução com o carreador e o fármaco foi vertida em um recipiente de silicone e o solvente foi removido completamente por evaporação a $60 \pm 5^\circ\text{C}$ sob pressão normal em estufa por aproximadamente 4 h. O filme obtido com a DS foi pulverizado com auxílio de gral de porcelana, pistilo e uma pequena quantidade de nitrogênio líquido para facilitar o processo de pulverização além de, evitar a indução da cristalização do fármaco devido ao calor. A DS resultante foi então tamisada em malha de 425 μm , acondicionada em cápsulas 00 em doses de 50 mg que então foram utilizadas para administração nos animais (COSTA, 2016).

Os ensaios de dissolução *in vitro* aplicados para a DS carregada de 10% de EFZ foram realizadas sob temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, utilizando 250 mL de tampão fosfato pH 6,8 como meio de dissolução em um dissolutor Varian[®]. Como resultado foi observado que quando o carreador PVPVA 64 está presente na formulação ocorre uma liberação imediata do fármaco durante os primeiros 15 min, o que não acontece com o EFZ na ausência de carreadores, além disso, foram avaliadas diferentes concentrações de EFZ junto com os polímeros, e os resultados mostraram que maiores valores de liberação do fármaco presente no meio foram encontrados quando continha maior valor de polímero, com apenas 10% do fármaco. Desta forma, a DS foi capaz de aumentar em até 10 vezes a solubilidade do EFZ quando comparado ao IFA isolado.

2.14 Farmacocinética

A ação farmacológica de um fármaco envolve uma complexa cadeia de eventos no organismo desde a sua administração por determinada via até sua chegada no sítio de ação, com conseqüente produção do efeito biológico. Desta forma, antes mesmo do fármaco atingir seu local de ação, o mesmo passa por diferentes etapas de interações com o organismo, o que irá caracterizar o seu movimento. Essas etapas compreendem quatro fenômenos: absorção, distribuição, metabolismo e excreção - ADME (HUISINGA et al., 2006).

Desse modo, a Farmacocinética pode ser entendida como o estudo do curso temporal dos processos ADME, que estão relacionados com a concentração do fármaco no organismo, refletindo no efeito terapêutico, onde sua compreensão depende de conhecimentos básicos de fisiologia, cinética química e bioquímica (TOZER, 1981; GIBALDI, 1991).

Após a introdução do fármaco no organismo, ocorre o processo de absorção que favorece e eleva as concentrações plasmáticas, fase esta denominada de INPUT, simultaneamente ocorre a distribuição para os tecidos junto com a eliminação, desfavorecendo as concentrações plasmáticas do fármaco, denominada de OUTPUT. Essa transferência do fármaco por vários processos fisiológicos gera movimentos que podem ser caracterizados por constantes de velocidade descritas matematicamente (BANKER; RHODES, 2002; SHARGEL, et al., 2005). Através de vários parâmetros farmacocinéticos obtidos pelas expressões matemáticas é possível a construção ou adequação de regimes posológicos, determinação de vias e modo de administração adequados, além da determinação das vias metabólicas e de excreção (VIEIRA, 2013).

O fenômeno da absorção ocorre somente nas administrações extravasculares, e é definido como a transferência do fármaco do local de administração para a circulação sistêmica, que irá direcioná-lo para diferentes órgãos e tecidos. A via oral é a mais utilizada para administrar fármacos pela sua facilidade e segurança, porém, possui impacto negativo que influencia significativamente o acesso do fármaco na circulação sanguínea. Para a absorção oral ocorrer em sua plenitude são requeridas duas etapas: a transposição da membrana do epitélio gastrointestinal – o que permite o acesso do fármaco à circulação sistêmica - e a passagem pelo sistema porta-hepático sem sofrer biotransformação significativa (LIN; LU, 1997; SHOENWALD, 2002).

O processo de absorção pode ser avaliado pelos seguintes parâmetros farmacocinéticos, obtidos após a construção da curva de concentração plasmática *versus* tempo: C_{max} (concentração plasmática máxima), t_{max} (tempo para a ocorrência de C_{max}), ASC (área sob a curva), k_a (constante de absorção), $t_{1/2}$ (meia-vida de absorção) F_{oral} (biodisponibilidade absoluta, quando a ASC da administração oral é comparada com ASC da administração intravenosa) e $F_{relativa}$ (biodisponibilidade relativa, quando compara a ASC de uma formulação referência com a ASC de uma formulação teste, realizando as devidas correções quando

houver administração de doses diferentes) (STORPIRTIS et al., 2009; WINTER, 2012).

Existem muitos fatores que podem afetar a absorção de fármacos, como o tempo de esvaziamento gástrico, trânsito intestinal, concentração e característica do fármaco, presença de alimentos, microbiota e atividade enzimática. Esses aspectos geram variabilidade interindividual e interespecies com relação aos parâmetros farmacocinéticos supracitados (FUCHS; WANNMACHER, 1998; RANG; DALE; RITTER, 1997; STORPIRTIS et al., 2009).

Após a introdução do fármaco na corrente sanguínea (denominado compartimento central), o mesmo sofre distribuição para órgãos e tecidos com alta perfusão sanguínea e também pode ser distribuído para tecidos periféricos com menor vascularização (denominado compartimento periférico). Esta distribuição depende das características intrínsecas da molécula (lipofilicidade, tamanho molecular e pKa), da ligação do fármaco às proteínas plasmáticas e elementos fisiológicos dos tecidos, como a perfusão sanguínea, pH e características da membrana. Posteriormente à distribuição, ocorre o equilíbrio entre o compartimento central e periférico que é rapidamente atingido em tecidos que recebem grande perfusão sanguínea (coração, pulmão, fígado, etc.) (OGA, 2003; STORPIRTIS et al., 2009).

O processo de distribuição de um fármaco é quantificado através do parâmetro volume de distribuição (Vd), que é definido como a extensão do fármaco que está diluído no organismo (STORPIRTIS et al., 2009). Através dos dados obtidos da concentração plasmática *versus* tempo, podem ser calculados três Vd diferentes: O Vd_c – volume de distribuição central, que representa o volume no compartimento central, retratando a distribuição de um fármaco no sangue e em tecidos com alta perfusão sanguínea; o Vd_{ss} – volume de distribuição no estado de equilíbrio, que determina o volume de distribuição dentro e fora dos tecidos e o $Vd_{\text{área}}$ - quando determina o volume de distribuição na fase de pseudo-equilíbrio. Os valores de cada Vd podem ser diferentes dependendo do número de compartimentos ocupados por determinado fármaco e pela oscilação que a concentração plasmática sofre graças ao movimento constante do fármaco no organismo (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a). A frequente aplicabilidade clínica do Vd está relacionada com o cálculo da dose de ataque, utilizada para

garantir que o fármaco atinja concentrações terapêuticas logo na primeira administração (BJORNSSON, 1997).

Os processos de metabolização e excreção ocorrem simultaneamente aos processos de distribuição após a absorção do fármaco, e são considerados, em conjunto, como a eliminação do fármaco. Os parâmetros farmacocinéticos que estão relacionados a esses processos são: *clearance* (Cl), meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) e constante de eliminação (k_{el}) (RUIZ-GARCIA et al., 2008).

O metabolismo é a conversão do fármaco em outra entidade química, metabólito ou produto de biotransformação, e na maioria das vezes, ocorre em etapas sucessivas e por intermédio de várias enzimas (STORPIRTIS et al., 2009). Após sofrer o processo de conversão, o metabólito pode apresentar atividade farmacológica semelhante ou até mais potente que o fármaco original, ser inativo ou apresentar perfil de toxicidade distinto e de maior risco (WINTER, 2004).

Normalmente as reações químicas ocorridas são subdivididas em duas fases: Fase I: reações não sintéticas catalisadas por enzimas microssômicas envolvendo oxidação, redução e hidrólise.

Fase II: reações sintéticas por intermédio de enzimas citosólicas envolvendo conjugação ou síntese.

Nas reações de Fase I, os fármacos são biotransformados em moléculas mais polares, enquanto que nas reações de Fase II, formam-se conjugados altamente hidrossolúveis facilitando sua eliminação (STORPIRTIS et al., 2009).

Embora alguns fármacos sejam metabolizados pelos rins, pulmão ou por enzimas presentes na parede gastrointestinal, o fígado ainda é considerado o principal órgão metabolizador por conter várias enzimas ou complexos enzimáticos especializados. Dentre eles, o complexo enzimático citocromo P450 (CYP) é considerado o principal responsável pela oxidação e redução da maioria dos fármacos. Este complexo enzimático apresenta várias isoformas com afinidades diferentes para determinado substrato, além de apresentar diferentes inibidores, indutores e fármacos marcadores (TOZER; ROWLAND, 2009; WINTER, 2012). A inibição dessas enzimas pode acarretar elevação da concentração plasmática de um fármaco que seja administrado concomitante ao inibidor, resultando em efeitos tóxicos ao paciente. A indução dessas enzimas ocasiona a falha terapêutica, em virtude do aumento da biotransformação de um fármaco, refletindo na diminuição

das concentrações plasmáticas o que pode leva-lo a ficar fora do intervalo terapêutico (OGA, 2003). Outro fator que pode contribuir para alterações dessas enzimas é o polimorfismo genético, que contribui para alterações do perfil cinético de vários fármacos levando a alta variabilidade interindividual nos processos de biotransformação de um fármaco (WINTER, 2012).

Outro metabolismo importante que acomete alguns fármacos é a metabolização pré-sistêmica ou metabolismo de primeira passagem. Nesta situação o fármaco após ser administrado pela via oral alcança primeiro o sistema porta expondo toda a dose administrada ao fígado, antes mesmo de alcançar a circulação sistêmica. Esse fenômeno contribui para a baixa biodisponibilidade do fármaco (WINTER, 2012).

O processo de excreção é caracterizado como a remoção irreversível do fármaco do organismo, que ocorre principalmente pela via urinária. Entretanto há casos em que o fármaco também pode ser excretado pelas fezes, bile, leite, suor, pulmões e por outras secreções, sob a forma inalterada ou modificada quimicamente (metabólitos) (OGA, 2003).

Considerado como os principais órgãos de excreção de fármacos, os rins, realizam esse processo por três mecanismos principais: filtração glomerular, secreção e reabsorção tubular (VAN DE GRAAFF, 2003). Fatores relacionados com as características do fármaco e do órgão podem determinar a excreção, como por exemplo, o grau de ionização, lipofilicidade, tamanho molecular, ligação a proteínas, fluxo sanguíneo renal e pH urinário (RANG; DALE; RITTER, 1997). Portanto, alterações nos parâmetros farmacocinéticos relacionados ao processo de eliminação, estão intimamente ligados a insuficiência renal que gera o acúmulo de fármaco e metabólitos no órgão por não serem excretados de maneira satisfatória (TOZER; ROWLAND, 2009).

O parâmetro farmacocinético que expressa a eficiência do processo de eliminação é o *clearance* (Cl) ou depuração, definido como o processo de remoção irreversível de determinada substância de um volume específico de sangue por unidade de tempo (STORPIRTIS et al., 2009; TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004b). Como o processo de metabolização e eliminação pode acontecer tanto pelo fígado e rins somados a outros processos que resultam na eliminação do organismo, o *clearance* pode ser subdividido em 3 tipos: *clearance* hepático (Cl_h), *clearance* renal (Cl_r) e *clearance* total (Cl_T), sendo esse último a somatória de todos. Este

parâmetro é considerado o mais importante dentro da farmacocinética por estar relacionado com a determinação da taxa de dose que deve ser administrada para manter as concentrações plasmáticas desejadas dentro da faixa terapêutica e também por proporcionar o ajuste de dose para pacientes com hepatopatias ou nefropatias (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004b). Este parâmetro pode sofrer influência da insuficiência hepática e/ou renal, promovendo mudanças expressivas também na meia-vida de eliminação (OGA, 2003; RANGE; DALE. RITTER, 1997).

Outro parâmetro muito importante utilizado na clínica é a meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) que expressa o tempo necessário para que a metade da concentração plasmática do fármaco seja eliminada do organismo, na fase de eliminação (SCHOENWALD, 2002). O parâmetro pode ser utilizado para selecionar o intervalo de dose de um regime posológico, prever o grau de flutuação da concentração plasmática durante o intervalo de dose, prever o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio e para prever o tempo necessário para que determinada concentração plasmática decline a outra concentração específica desde que não seja administrada uma nova dose (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004c).

2.14.1 Modelos farmacocinéticos

A maneira mais simples de representar os processos ADME é através de expressões matemáticas que permitem descrever a evolução temporal das concentrações plasmática do fármaco no organismo após sua administração por determinada via. Essas expressões são descritas na literatura como modelos compartimentais e modelos não compartimentais, sendo o primeiro o mais abordado e aplicado (FUCHS; WANNMACHER, 1998; KWON, 2002).

Os modelos compartimentais são os mais aplicados por serem mais simples, tendo como premissas a homogeneidade de distribuição e o equilíbrio instantâneo das concentrações do fármaco dentro do compartimento (SOMOZA, 2008).

2.14.2 Modelos compartimentais

Neste modelo, o organismo é tratado como compartimentos, subdivididos em monocompartimental (um compartimento), bicompartimental (dois compartimentos)

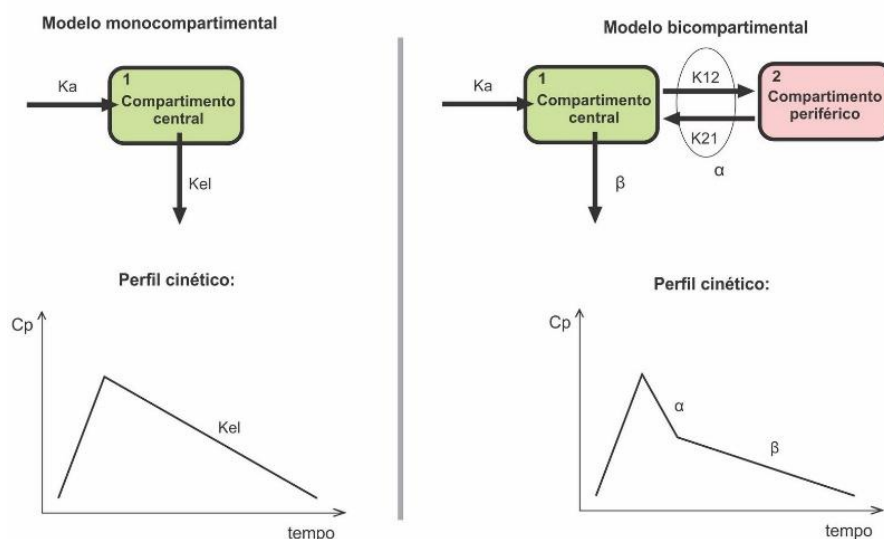
ou multicompartmental (mais de dois compartimentos, porém menos frequente). Para definição de qual modelo deve ser aplicado é necessária a transformação dos dados de concentração plasmática em logaritmo natural (“ln”) e a plotagem desses *versus* tempo em um gráfico, para verificar o seu perfil de decaimento das concentrações (BROCKS, 2010; SCHOENWALD, 2002; STORPIRTIS et al., 2009).

O modelo monocompartimental é o mais simples e pressupõe que o fármaco seja absorvido (administração extravascular) e distribuído de modo instantâneo e homogêneo por todos os líquidos e tecidos do organismo (LARA, 2004), e quando o seu perfil cinético é traçado após “plotagem” da concentração *versus* tempo, este possui apenas uma inclinação na sua fase de eliminação (STORPIRTIS et al., 2009).

Já o modelo bicompartimental, apresenta duas velocidades de decaimento das concentrações plasmáticas ao longo do tempo, pois esse modelo admite que o organismo seja composto por dois compartimentos que intercambiam o fármaco entre si através da distribuição em velocidades diferentes (STORPIRTIS et al., 2009).

No modelo monocompartimental, como somente existe uma velocidade de decaimento das concentrações plasmáticas, a constante de eliminação que representa tal fenômeno é denominada K_{el} , porém, o modelo bicompartimental por apresentar duas velocidades na reta de decaimento é representado em duas fases distintas: fase de distribuição ou fase α e fase de eliminação ou fase β (MORENO; DOMÉNECH, 2001). Na figura 9 estão representados esquematicamente os modelos compartimentais descritos acima junto com o seu perfil cinético, considerando administração extravascular de um fármaco.

Figura 9: Representação esquemática dos modelos compartimentais, junto com seu perfil cinético considerando administração extravascular de um fármaco. Fonte: Autoria própria.



2.14.3 Farmacocinética pré-clínica no desenvolvimento de novos fármacos

A busca pelo desenvolvimento de novos medicamentos e a modificação de medicamentos existentes com o intuito de diminuir os seus problemas na terapêutica é constante entre as companhias farmacêuticas e o ambiente acadêmico. Este processo que demanda muitos anos de pesquisa e bilhões de dólares investidos pode ser dividido em dois tipos de processos: a inovação radical e a inovação incremental (DAVANÇO, 2015).

A inovação radical consiste na pesquisa e desenvolvimento de moléculas inéditas, podendo ser de origem sintética, derivadas de processos biotecnológicos ou de substâncias naturais. Já a inovação incremental consiste na melhoria das características biofarmacêuticas de um fármaco, visando o melhoramento da eficácia, segurança e adesão à terapia. Esta por sua vez é a mais utilizada, pelas vantagens do menor tempo de desenvolvimento e na maior probabilidade de sucesso, dado ao fato de se trabalhar com moléculas para as quais já foram realizados estudos pré-clínicos e clínicos. Contudo essas novas modificações farmacêuticas devem passar por testes complexos que demandam alguns anos até que se encontre um produto viável para a realização dos testes clínicos (KHANNA, 2012; PETROVA, 2014).

Dentre os testes disponíveis para avaliar as melhorias do novo desenvolvimento de um fármaco, estão os ensaios farmacocinéticos que visam o conhecimento da disposição cinética do fármaco no organismo. Esta avaliação é antecedida pelos ensaios *in vitro* que auxiliam no processo de seleção dos melhores adjuvantes baseados nas características particulares de cada fármaco (estabilidade, desintegração, friabilidade, etc.), e principalmente os testes de dissolução, que avaliam a cinética de liberação do fármaco da matriz biológica (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2005; ARAÚJO et al., 2010; HUGHES et al., 2011).

Após os ensaios *in vitro*, os estudos farmacocinéticos pré-clínicos (*in vivo*), são importantes para a seleção do produto que apresenta melhor aprimoramento das características farmacotécnicas, oferecendo suporte na decisão da continuidade dos estudos com o candidato a fármaco. Essa é uma triagem fundamental para comprovar sua eficácia e segurança, possibilitando o mesmo alcançar a fase clínica sem ocorrência de insucesso (VIEIRA, 2013; DAVANÇO, 2015).

2.15 Modelo animal

O emprego de animais laboratoriais em estudos experimentais apresenta inúmeras características positivas e facilitadoras quando comparadas aos experimentos em humanos, destacando-se a facilidade na manutenção e observação; a utilização de grandes quantidades de indivíduos; e o curto ciclo vital, o que permite o acompanhamento pleno de várias e distintas fases do desenvolvimento (puberdade, prenhez, lactação, etc.). O experimento com animais permite, ainda, a padronização do ambiente e a padronização genética e para estudos que necessitam de manejo com tumores o transplante e transmissão são simples. A disponibilidade de informações acerca das características fisiológicas dos animais experimentais é também uma grande vantagem do seu emprego nos estágios iniciais de estudos científicos. Este conhecimento permite o levantamento de hipóteses com base em suas características peculiares, o que pode direcionar os caminhos para estudos mais aprofundados do tema em etapas posteriores (SOUZA; MERUSSE, 1996).

Embora a utilização de modelos animais para estudos laboratoriais possua papel positivo pela busca de respostas na ciência, é natural que sua fisiologia cause grande impacto nos resultados buscados, por se diferenciar da fisiologia humana, espécie para a qual normalmente se pretende extrapolar os resultados. Um exemplo deste fato é a influência, de forma expressiva, na disposição cinética de fármacos. Frente a esse fato é importantíssimo conhecer o modelo animal que será empregado no estudo em questão.

O coelho (*Oryctolagus cuniculus*), é um pequeno mamífero cuja classificação taxonômica é: Reino: Animalia, Filo: Chordata, Classe: Mamalia, Ordem: Lagomorpha, Família: Leporidae, Gênero: *Oryctolagus*, Espécie: *oryctolagus cuniculus*, Raça: Nova Zelândia.

Sua origem é muito discutida, porém, a maioria dos pesquisadores acredita que eles são provenientes da Península Ibérica – mais precisamente da Espanha - e do norte da África, considerado uma espécie silvestre e naturalmente agressiva, eles sofreram domesticação em mosteiros franceses na Idade Média, o que garantiu o surgimento de um grande número diversificado nas raças, cores e pesos. Atualmente são consideradas uma das principais espécies convencionais de

laboratório, decorrência da seleção genética e da convivência com o homem, o que os tornaram animais dóceis e de fácil manejo (LOPES; SOUZA, 1999).

Esses animais foram um dos primeiros a serem utilizados na investigação biomédica por Pasteur, em 1884, que demonstrou que os cães podiam ser protegidos contra o vírus da raiva, graças a mediação de suspensões da medula de coelhos infectados experimentalmente com o vírus dessa enfermidade. Em virtude da hipersensibilidade dessa espécie, os coelhos são muito utilizados na prova de irritantes cutâneos primários, rubefacientes, fotossensibilizadores, irritantes dos olhos, outros alérgicos e a capacidade pirógena de preparados farmacológicos e biológicos. Outra característica importante para o seu emprego laboratorial são as grandes veias marginais e artéria central de suas orelhas, que proporcionam um acesso fácil ao sistema circulatório, constituindo-se um recurso valioso na coleta sanguínea e também na investigação sorológica e imunológica (ANDRADE et al., 2002).

Dentre as principais raças utilizadas em procedimentos laboratoriais, destacam-se as seguintes:

Nova Zelândia – peso entre 4 a 6 kg, grande docilidade, fácil reprodução e manejo, e com uniformidade de reações nas provas experimentais;

Gigantes de Flandres – atinge mais de 6 a 10 kg, preferido para obtenção de soro imunológico;

Califórnia – peso entre 3 a 5 kg. Apresenta diversas zonas pigmentadas em negro sobre o fundo branco, sua principal característica é a rusticidade;

Holandês – com menos de 2,5 kg, é bastante utilizado como animal de experimentação em virtude de seu pequeno porte e resistência às contaminações ambientais.

Seu comportamento, de maneira geral, é a docilidade, podendo morder ou arranhar em razão da contenção incorreta. São susceptíveis ao estresse e assustam com facilidade. De forma alguma se devem manter machos adultos em uma mesma gaiola, para evitar brigas por disputa de território, regra aplicada também as fêmeas adultas por apresentarem pseudogestação (ANDRADE et al., 2002).

Como principais características anatômicas e fisiológicas os coelhos possuem corpo longilíneo, cabeça grande provida de largas orelhas, com audição e olfato bem

desenvolvidos e amplo campo de visão. As patas posteriores são mais compridas que as anteriores, o coração se encontra situado na parte média da caixa torácica, ligeiramente desviado para a esquerda, e não possui a aorta anterior. A temperatura média corpórea é de 38,3°C, podendo chegar a 39°C quando submetido a condições de estresse, esses animais são mais sensíveis ao calor do que ao frio, sendo a temperatura e umidade relativa recomendável de 17 a 21°C e 40 a 60%, respectivamente. A fase da infância vai aproximadamente da fase do desmame, por volta dos 35 dias, até os cinco meses de idade, fase em que naturalmente se inicia a adolescência, já a fase adulta inicia-se por volta de 1-2 anos de idade. A expectativa de vida desses animais é de aproximadamente 5 - 6 anos (ANDRADE et al., 2002).

O coelho é um animal monogástrico, herbívoro e que se alimenta de praticamente todos os tipos de grãos, verduras e pastos, ou seja, alimentos ricos em fibras. A principal característica de sua fisiologia digestiva é possuir um ceco grande, o qual produz fermentação bacteriana considerável e a síntese de vitaminas; são animais praticantes da coprofagia noturna ou quando se encontra em grande escassez de alimento, coletando fezes diretamente do ânus. Sobre a importância da coprofagia, dispõe-se de reduzida informação, porém, supõe-se que sua utilização junto com a fermentação fecal, proporcionam as quantidades necessárias das vitaminas do grupo B, protegendo o animal contra algumas deficiências de aminoácidos essenciais, essa prática também facilita a digestão adicional de fibra e outros nutrientes, por uma segunda passagem através do trato digestivo (CUNHA, 2000).

As rações comerciais utilizadas para alimentar coelhos são peletizadas com diâmetro máximo de 50 mm por 70 mm de comprimento, e devem conter todos os nutrientes necessários: proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas e outros. Os coelhos da raça Nova Zelândia adultos (que foram empregados neste estudo), consomem em média de 100 a 200 g por dia de ração. As fêmeas com lactentes precisam de quantidades maiores de ração, que deve ser aumentada gradualmente com o crescimento dos filhotes. A quantidade de ração recomendada deve ser oferecida uma vez ao dia, evitando assim o aumento do consumo de alimento, o que propicia a engorda dos animais, prejudicando, principalmente, a capacidade reprodutiva (FERREIRA et al., 2011).

Após a mastigação e deglutição, os alimentos chegam ao estômago do coelho onde permanecem cerca de 4 a 6 h, sofrendo a ação do suco gástrico. O pH

estomacal, normalmente, é inferior a 2,5 embora variável em relação ao período do dia e com a região do estômago considerada, outro fato importante que foi relatado por Gidenne e Lebas (1984) é que durante a prática da coprofagia, o pH estomacal pode chegar facilmente a 3.

Um estudo das variáveis que interferem no trânsito digestivo do coelho foi apresentado por Lebas (1979) que determinou com ajuda de marcadores, os tempos médios de retenção de partículas presentes no estômago com dietas consideradas normais para animais em crescimento e animais adultos, demonstrando um tempo variável de 14 a 21 h e 4 a 9 h, respectivamente.

A água deve ser providenciada diariamente e *ad libitum*. O consumo de água normal de um coelho de dois meses de idade é de 120 mL/kg/dia, e de um coelho de 1 ano de idade é de 64 mL/kg/dia. Os bebedouros (com capacidade de 1 L) devem ser trocados e higienizados diariamente (FERREIRA et al., 2011).

O ciclo circadiano dos coelhos foi avaliado em um estudo por Smith & Gregory (1989) onde os pesquisadores utilizaram trinta coelhos divididos em cinco grupos: Grupo I (n=8) recebeu ciclo de luz diário de 12/12 h, com luzes acessas às 06 h; Grupo II (n=8) recebeu ciclo de luz diário de 12/12 h, com luzes acessas às 19:30 h; Grupo III (n=8) exposto à luz a partir das 06 h por 12 h e depois permaneceram em total escuridão até o fim do estudo e Grupo VI (n=6) exposto à luz a partir das 19:30 h por 12 h e depois permaneceram em total escuridão até o fim do estudo. Para avaliação, os animais receberam uma injeção intravítrea em ambos os olhos de 10 µl de solução aquosa estéril FITC-dextrano a 10% (solução fluorescente), da qual foi medida a concentração a cada 3 h por 7 dias através de fluorometria ocular e calculada a sua concentração levando em consideração o fluxo sanguíneo exercido no globo ocular. As médias encontradas para os grupos: I, II, III e IV foram: $2,06 \pm 0,08 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, $2,20 \pm 0,06 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, $1,52 \pm ,007 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ e $1,28 \pm 0,07 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente, não mostraram diferença estatística significativa, portanto, foi concluído que mesmo com regime de luzes diferentes, o ciclo circadiano dos coelhos não era afetado.

Durante o período de sonolência, que os acomete principalmente à tarde, o olho fica recoberto por uma segunda pálpebra transparente, deixando transparecer que estão dormindo de olhos abertos, porém estão em sono superficial, tanto que se assustam ao serem tocados (MENENDEZ, 1985; ANDRADE et al., 2002).

Os animais devem ser alojados em gaiolas individuais, com dimensões mínimas de 45x60x40 cm, a partir dos 2 meses de idade. A puberdade ocorre entre 150 – 180 dias, com peso entre 3 a 3,5 kg, a relação entre macho e fêmea, para acasalamento, é de 1 macho para cada 10-12 fêmeas reprodutoras (MOURA, 2013).

Os coelhos são animais prolíferos precoces, possuem um rápido ciclo reprodutivo, estando aptos a fecundar e gestar por volta dos 5 meses de vida. O sistema genital e reprodutor das fêmeas é constituído de dois cornos uterino e ambos se comunicam, separadamente, com a vagina. A coelha está incluída entre os animais de ovulação provocada, ou seja, somente após a cópula ou uma forte excitação sexual, ocorre o processo de ovulação. Já os machos não possuem glândula e nem vesículas seminais (MOURA, 2013).

O modelo animal utilizado neste estudo apresenta multiplicidade superior de formas da CYP2C quando comparados aos humanos, segundo Pasanen (2004) esta característica ocorre para suprir a deficiência de CYP3A, enzima amplamente catalítica responsável pela metabolização da maioria dos fármacos. O perfil da enzima 2C se difere em nove formas: 2C1, 2C2, 2C3, 2C4, 2C5, 2C14, 2C15, 2C16, 2C30, responsáveis principalmente pela catálise da testosterona nos coelhos. Nesses animais ocorre também a expressão de isoformas que diferem das encontradas no homem, como: 2B4, 2B5 e 2B6, e a ausência da CYP2D6. Genes de duas CYP2D, sendo 2D23 e 2D24 foram encontradas, porém, as proteínas ainda não foram completamente caracterizadas e elucidadas. Os coelhos são extremamente sensíveis a penicilina, que pode causar distúrbios em sua flora intestinal e produzir diarreia e a ampicilina é extremamente tóxica.

O peso corporal é o fator com maior influência no tamanho da vesícula biliar (SHAW; HEATH, 1974; KASSY et al., 2017), e segundo Sohn e Couto (2012) a secreção biliar é contínua e hormônios como gastrina e secretina não parecem afetar a produção da bile. O fluxo biliar dos coelhos (130 mL/d/kg) é superior comparado com os humanos (2,2 – 22,2 mL/d/kg) e de outras espécies, o que contribui de forma direta com a solubilidade de compostos lipossolúveis (KARARLI, 1995).

A urina é normalmente alcalina, com alto teor de cristais de fosfato e carbonatos, sua cor oscila de amarelo intenso ou turvo-pardo, o que pode ser facilmente confundida com processo inflamatório purulento (ANDRADE et al., 2002). Devido à alta demanda do organismo por cálcio, o coelho apresenta absorção

diferenciada desse mineral pelo intestino, possuindo também um sistema renal adaptado para excreção de grande quantidade de cálcio pela urina (KASSY et al., 2017).

O coelho é um dos poucos animais que possuem uma visão posterior do corpo devido a posição dos olhos lateralmente a cabeça. A cor dos olhos está relacionada a cor da pelagem, que normalmente se acompanham. Os coelhos de pelagem branca possuem normalmente os olhos despigmentados (transparente) e a coloração vermelha está relacionada com a vascularização sanguínea no fundo dos olhos (PINTO, 2009).

Quanto ao sistema respiratório, o coelho apresenta uma respiração diafragmática, não possui glândulas sudoríparas e sua frequência respiratória está em torno de 50 a 60 movimentos respiratórios por min (PINTO, 2009).

Esses animais são afetados por uma variedade de doenças que podem interferir na sua utilização em experimentação, principalmente as que afetam o trato respiratório e intestinal. Dentre elas uma das mais importante é a pasteurelose, doença respiratória contagiosa de origem bacteriana, que causa infecção do trato respiratório superior com rinite e conjuntivite crônica e mucopurulenta. Sua transmissão se deve com contato direto com animais infectados ou por intermédio de equipamentos contaminados e pelo técnico. O diagnóstico é confirmado pelos sintomas e pelas lesões, porém, o tratamento que é baseado em antibióticos é de baixa eficácia. O único método eficaz da erradicação da doença é o descarte de toda a colônia, esterilização dos equipamentos e da sala, além da obtenção de animais isentos de infecção (ANDRADE et. al., 2006).

Outra enfermidade comum entre os coelhos é a doença de Tyzzer, causada pelo *Baccillus piliformis*, é transmitido pelo contato oral direto sendo as idades de 3 a 12 semanas mais susceptíveis. O quadro clínico é caracterizado por diarreia líquida a mucoide, profusa e espontânea, seguida de morte num período que varia de 12 a 72 h. Outras doenças de origem bacteriana como: salmonelose, necrobacilose, pseudotuberculose, espiroquetose, tularemia, tubercusole, pseudomonas e mastite são pouco frequentes, consideradas até mesmo como raras, porém, os coelhos são susceptíveis a infecção com quadro clínico pouco promissor, levando o animal a óbito a poucos dias (ANDRADE et. al., 2006).

Também os coelhos podem contrair doenças infecciosas de origem viral sendo as principais: Varíola dos coelhos, transmitida por contato direto ou através de equipamentos contaminados; fibroma de Shope, transmitido por mosquitos ou ácaros vetores; e mixomatose, transmitida por contato direto ou por insetos vetores, em que todas possuem curso fatal. A melhor maneira de erradicação da doença é a eutanásia dos animais infectados e esterilização das gaiolas e equipamentos (ANDRADE et. al., 2006).

Todas as informações sobre a fisiologia e características comportamentais e sociais de um modelo animal devem ser consideradas quando este modelo é utilizado para estudos experimentais, assim como o conhecimento dessas características pode auxiliar a compreensão dos resultados obtidos após a execução do protocolo experimental.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os parâmetros farmacocinéticos do EFZ na administração da DS desenvolvida pelo LTM/UFPE e comparar com o perfil farmacocinético do EFZ na administração do insumo farmacêutico ativo – IFA em modelo animal.

3.2 Objetivos Específicos

Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para a quantificação de efavirenz em plasma de coelhos por UPLC;

Avaliação do perfil farmacocinético do efavirenz veiculado em dispersão sólida administrado em dose única por via oral;

Avaliação do perfil farmacocinético do insumo farmacêutico ativo (IFA) de EFZ administrado em dose única por via oral;

Avaliação do perfil farmacocinético do insumo farmacêutico ativo do EFZ por administração intravenosa;

Calcular os parâmetros farmacocinéticos do EFZ nos diferentes grupos e compara-los.

4 MATERIAL

4.1 Soluções padrão, solventes, reagentes e matriz biológica

O padrão de EFZ (para preparação da solução estoque) utilizado foi adquirido do Laboratório Farmacêutico de Pernambuco - LAFEPE, sendo a solução estoque preparada em metanol na concentração de 100 µg/mL. O Diazepam (DZP) utilizado como padrão interno (PI) foi solubilizado em acetonitrila na concentração de 25 µg/mL.

O solvente acetonitrila empregado para extração líquido-líquido no procedimento bioanalítico e na fase móvel do sistema cromatográfico foi obtido da J.T.Baker (México), o solvente metanol usado como componente da fase móvel do sistema cromatográfico foi obtido da J.T.Baker (México), ambos grau HPLC. A água utilizada como fase móvel foi obtida do sistema de purificação Mili Q[®]. As soluções de ácido fórmico obtido da Scharlab S.L[®] e de trietilamina obtida da SIGMA-Aldrich[®] foram utilizados como modificador de pH.

As solução-padrão de EFZ e DZP foram mantidas sob refrigeração a 8°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) durante a validação do método bioanalítico.

Este mesmo padrão de EFZ foi utilizado para administração no grupo animal EFZ – IV e EFZ – ORAL IFA.

A dispersão sólida de EFZ utilizada para administração no grupo animal ORAL-DS, foi preparada e disponibilizada pelo Laboratório de Tecnologia de Medicamentos da Universidade Federal de Pernambuco (LTM-UFPE).

O plasma utilizado como matriz biológica foi obtido de coelhos *Neozelandeses*, sendo armazenado e congelado a -10°C até o uso.

A heparina utilizada para impedir o processo de coagulação nos microtubos foi adquirida na concentração de 5.000U.I./mL da Blau Farmacêutica[®].

O dimetilsulfóxido e o tween 80 utilizados para auxiliar a solubilização do EFZ foi obtida da Labsynth – Produtos para Laboratório Ltda.

4.2 Equipamentos

- UPLC[®] Acquity, Waters;
- Detector UV-Vis Waters[®];
- Coluna de guarda Acquity UPLC[®] CSH VanGuard (2,1 x 5 mm; 1,7 μ m; 3/pkg);
- Coluna Acquity UPLC[®] CSH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 μ m);
- Banho ultrassônico, Ultrasonic Cleaner 2840DA, Odontobrás[®];
- Peagâmetro digital pG 1800 Gehaka[®];
- Balança AY220, Shimadzu[®];
- Vórtex AP56, Phoenix[®];
- Centrífuga 5810 R, Eppendorf[®];
- Evaporador à vácuo, miVac Duo Concentrator, Genevac[®];
- Seringa 1mL BD[®];
- Filtro de seringa de PTFE, poro de 0,22 μ m, Analítica[®];
- Sistema Mili Q[®].

4.3 Softwares

- Empower 3, Waters[®];
- Prism5, GraphPad[®];
- InStat, GraphPad[®].

5 MÉTODOS

5.1 Desenvolvimento do Método Bioanalítico

5.1.1 Sistema Cromatográfico

As condições cromatográficas para quantificação de EFZ em plasma foram baseadas no trabalho de Chiappetta et al., (2011). A análise foi realizada utilizando sistema de cromatografia líquida ACQUITY UPLC® (Waters) equipado com detector UV-Vis, operando a 245 nm. A separação dos compostos foi realizada por coluna ACQUITY UPLC® CSH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 µm) e coluna de guarda ACQUITY UPLC® CSH VanGuard (2,1 x 5 mm; 1,7 µm; 3/pkg). A fase móvel foi constituída dos solventes trietilamina 0,1% com pH 4 ajustado com ácido fórmico (vol/vol), metanol e acetonitrila (30:20:50), operando em modo isocrático e vazão de 0,30 mL/min. As amostras foram mantidas a 10°C até a injeção, enquanto a coluna foi mantida a 35°C durante a separação cromatográfica. O volume de injeção foi de 2 µL.

5.2 Preparo da Amostra

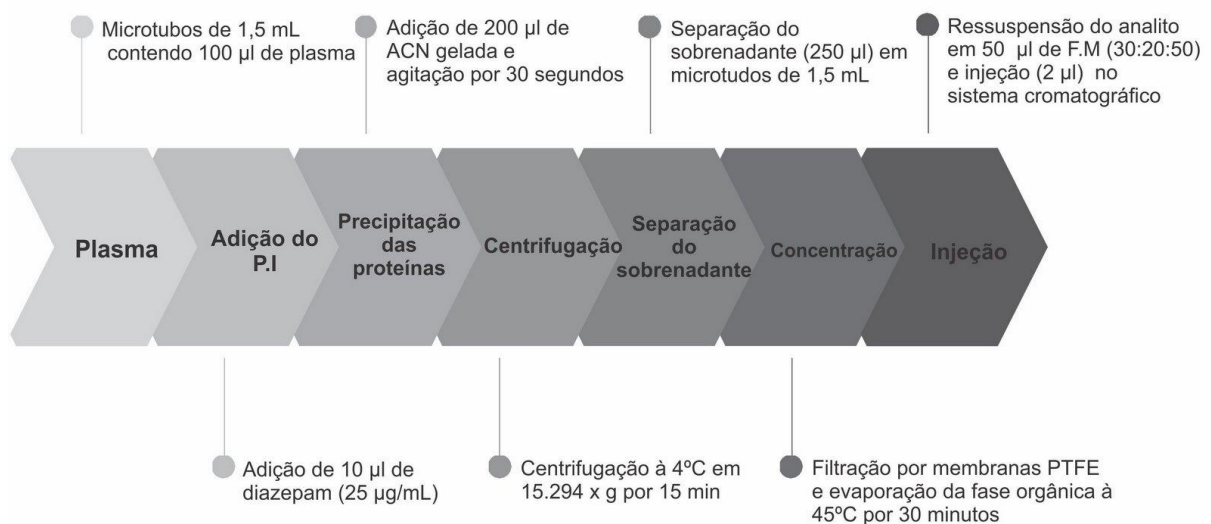
5.2.1 Padrão Interno

O PI utilizado foi o diazepam na concentração de 25 µg/mL solubilizado em acetonitrila. A aplicação do PI permite a correção de eventuais erros na extração, visto que se durante o procedimento ocorrer alguma perda, esta será tanto do analito de interesse quanto de PI, corrigindo a proporção entre eles. Portanto, a construção da curva de calibração a partir dos valores de razão área/área PI gera dados mais confiáveis.

5.2.2 Extração por precipitação de proteínas

Em um microtubo plástico de 1,5 mL contendo 100 µL de plasma, foram adicionados 10 µL de PI (diazepam 25 µg/mL diluído em acetonitrila pura), 200 µL acetonitrila gelada -20°C (para precipitação das proteínas presente no plasma) e em seguida a mistura foi agitada em vortex por 30 seg. A mistura foi, então, centrifugada por 15 min a 15.294 x g a 4°C. Retira-se 250 µL do sobrenadante, sendo filtradas com auxílio de membranas de polipropileno (0,22 µm) e evapora-se a 45 °C no evaporador concentrador-Mivac até a secura, em seguida as amostras foram ressuspensas com 50 µL de fase móvel, sendo 2 µL injetados no sistema cromatográfico.

Figura 10: Esquema do processamento de amostras.



Fonte: Autoria própria.

5.3 Validação do método bioanalítico

A validação compreende a avaliação de todas as etapas utilizadas para a quantificação do composto no método bioanalítico com a finalidade de determinar os seus limites de confiança. Neste trabalho esta avaliação foi fundamentada com base nas normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de acordo com a resolução RDC nº27, de maio de 2012, assim como no DRAFT Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation de setembro de 2013 da Food and Drug Administration (FDA), avaliando os parâmetros seletividade, linearidade, precisão e

exatidão, limite inferior de quantificação, recuperação e estabilidade de armazenamento.

5.3.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de diferenciar e quantificar o composto de interesse de outros compostos, sejam eles produtos de degradação, impurezas, componentes da matriz ou ainda fármacos de uso concomitante. Deve ser realizada a análise da matriz pura e não deve haver picos interferentes nos tempos de retenção do fármaco e do padrão interno.

5.3.2 Linearidade

A linearidade é definida como a capacidade de o método ter proporcionalidade entre as concentrações do analito e a resposta adquirida pelo sistema cromatográfico. Este parâmetro pode ser avaliado através da realização da curva de calibração. Para a construção das curvas de calibração foi utilizado um pool de plasma de coelhos *Albinos Neozelandês*.

Uma alíquota de plasma foi enriquecida com solução concentrada (100 µg/mL) de EFZ para 10 µg/mL e a partir desta realizaram-se diluições seriadas para obter as concentrações finais de 0,078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 8; 10 µg/mL em plasma, seguidos da extração. A curva foi realizada em triplicata e com nove níveis de concentração.

A curva de calibração foi construída a partir da razão da área do pico do analito (EFZ) e do PI (DZP) (área do analito/área do PI) projetados no eixo “y” (áreas obtidas através da média das triplicatas injetadas) contra a concentração nominal do analito (EFZ) projetado no eixo “x”.

Como critérios de aceitação da linearidade, a curva, deve apresentar coeficiente de correlação acima de 0,98, exatidão variando entre 85 e 115%, podendo apenas o limite inferior de quantificação variar entre 80 e 120%.

5.3.3 Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

O limite inferior de quantificação (LIQ), deve ser expressado com no mínimo 5 replicatas, é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão de 80-120% e exatidão 0-20%, devendo apresentar uma resposta no mínimo cinco vezes superior a qualquer ruído da amostra branco no tempo de retenção do fármaco.

5.3.4 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas por análise de amostras em intracorridas e intercorridas. A precisão tem como principal objetivo verificar a proximidade e concordância entre as replicatas analisadas, já a exatidão verifica a proximidade do valor encontrado com o valor de referência, ou seja, a concentração nominal. Ambos os ensaios foram realizados utilizando o LIQ, os controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM), alto (CQA) e diluído (CQD) e todos em quintuplicata. Para aprovação, os valores de precisão deveriam se encontrar entre 0 e 15% e os de exatidão entre 85 e 115%.

5.3.5 Recuperação

A recuperação tem como objetivo verificar a eficiência da extração empregada verificando a perda do analito decorrente do processamento da amostra bioanalítica. A recuperação não precisa ser de 100%, mas deve ser constante, precisa e reprodutível.

5.3.6 Efeito Residual

O efeito residual ocorre quando há o aparecimento ou aumento do sinal do analito ou PI devido à contaminação por amostra analisada anteriormente, sendo assim sua presença determinada a partir da análise de uma amostra branco, seguida da maior concentração da curva, e então a amostra branco mais duas vezes. A resposta de picos interferentes não deve ser superior a 20% para o fármaco e 5% para o PI.

5.3.7 Estabilidade de armazenamento

A estabilidade foi avaliada em função da necessidade de armazenamento das amostras após cada coleta e o seu processamento (tempo em que as amostras permaneceram dentro do equipamento).

O ensaio de estabilidade tem como finalidade verificar se o analito permanece quimicamente inalterado sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo, indicando assim as condições que o analito pode ou não ser submetido.

Foram realizados os ensaios de estabilidade de curta duração (temperatura ambiente) por 6 h, de longa duração (-20°C por vinte e sete dias), pós-processamento (10°C) por 3 h e de congelamento e descongelamento (dois ciclos a -20°C). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas do CQA e CQB, sendo o resultado definido como estável ou não quando os mesmos apresentarem desvio padrão relativo (DPR) maior que 15% em comparação a amostras recém-preparadas.

5.4 Protocolo Experimental

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, sob o número CEUA/FCF/CAR: 13/2016 (anexo I).

5.5 Animais

Para o estudo foram utilizados coelhos *Albinos* ou *Branco*s da raça *Nova Zelândia*, com peso na faixa de 2,8 a 3,5 kg (aproximadamente 34 semanas), 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 Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, onde foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12 h, luzes acesas as 07 h) e alimento e água foram fornecidas. Os experimentos foram realizados na fase de claro, iniciando-se as 15 h, e os animais foram privados de alimento e água por 6 h

anteriores à administração do medicamento. Após administração os animais permaneceram privados de alimentos e água por um período de 4 h.

O modelo animal foi selecionado com base na facilidade de manipulação e administração da forma farmacêutica (cápsula) e pelo uso desta espécie em estudos farmacocinéticos (SINGH et al., 2012; VIDYADHARA, 2013).

Ao final do experimento todos os animais foram submetidos à eutanásia por exposição a gás carbônico (CO₂), conforme recomendado na resolução nº1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

No presente estudo foram utilizados dois tipos diferentes de cápsulas contendo EFZ, uma contendo o fármaco em seu insumo farmacêutico ativo, sem qualquer adição de excipientes, e outra contendo a dispersão sólida de EFZ complexado ao copolímero PVPVA 64. Ambos foram disponibilizados pelo Laboratório de Tecnologia de Medicamentos da Universidade Federal de Pernambuco - LTM em parceria com o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE).

As cápsulas contendo o EFZ carregado por sistema de liberação DS com copolímero PVPVA 64 – EFZ 10% foram caracterizadas por ensaios físico-químicos e dissolução *in vitro*, realizados nas dependências do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

5.6 Delineamento experimental

5.6.1 Cálculo amostral

Para o cálculo do tamanho da amostra adotamos aquele estabelecido pela regulamentação da ANVISA (RE 898/2003); que se baseia na publicação de Chow e Liu (2000). Tal procedimento considera o nível de significância, o poder do teste e coeficiente de variação do parâmetro a ser estudado. Calculou-se o tamanho amostral mínimo, com um intervalo de confiança de 95% e poder de 80% para detectar uma diferença superior a 20% entre os grupos de animais que serão utilizados. O coeficiente de variação (CV) considerado foi de 13,24%, considerando a variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos do EFZ apresentados no estudo de BALANI et al., (1998).

Iniciou-se o cálculo com a proposta inicial de 5 replicatas e assim calculou-se a iteração para a obtenção do valor de n:

$$n \geq [t(\alpha, 2n-2) + t((1 - \beta)/2, 2n-2)]^2 \times (CV/20)^2$$

$$n \geq [t(0,05,8) + t(0,1,8)]^2 \times (CV \text{ adotado}/20)^2$$

$$n \geq [2,31+1,86]^2 \times (13,24/20)^2$$

$$n \geq 17,3889 \times 0,438$$

$$n \geq 7,6n=8$$

em que: α = nível de significância; β = poder do teste; e CV = coeficiente de variação.

Utilizou-se o resultado obtido para a iteração:

$$n \geq [t(0,05,14) + t(0,1,14)]^2 \times (13,24/20)^2$$

$$n \geq [2,14+1,76]^2 \times 0,438$$

$$n \geq 15,21 \times 0,438$$

$$n \geq 6,7n=7$$

Nova iteração:

$$n \geq [t(0,05,12) + t(0,1,12)]^2 \times (13,24/20)^2$$

$$n \geq [2,18+1,78]^2 \times 0,438$$

$$n \geq 15,68 \times 0,438$$

$$n \geq 6,86n=7$$

Sendo assim, consideramos o número mínimo de 7 replicatas por tempo como necessárias para termos resultados de qualidade sob o ponto de vista estatístico.

5.6.2 Grupos Experimentais

Foram utilizados 21 animais no presente estudo, distribuídos aleatoriamente em três grupos:

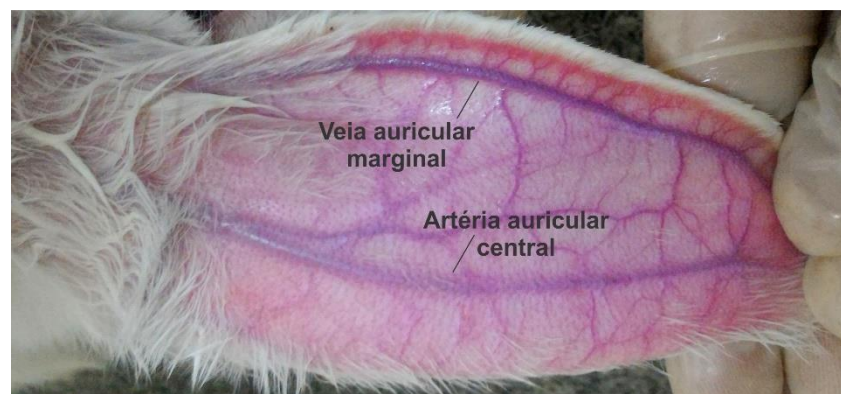
Figura 11: Grupos experimentais.



Fonte: Autoria própria.

O grupo IV é muito importante para este estudo, pois a partir dele calculamos a biodisponibilidade absoluta (F oral) do EFZ administrado por via oral. A veiculação do EFZ para administração IV foi através de dimetilsulfóxido (DMSO) - para auxiliar na solubilização do EFZ - não ultrapassando o limite recomendado por Neervanan (2006) e sua dose foi obtida através da extrapolação alométrica para coelhos a partir do trabalho de Balani et al., (1998) que utilizaram doses de 5 mg/kg em ratos wistar. A solubilização do EFZ se deu da seguinte forma: 9,09% Tween 80, 9,09% DMSO e 81.82% Tampão Trietanolamina – TRIS pH 8 e sua administração foi realizada na veia auricular marginal dos animais (figura 12).

Figura 12: Orelha tricotomizada esquerda do coelho com identificação da artéria e veia auricular.



Fonte: autoria própria.

Utilizando um aplicador de comprimidos e cápsulas, comumente utilizado na clínica veterinária para administração em cães, as cápsulas de EFZ foram administradas em dose única na porção inicial do esôfago dos coelhos (figura 13), simultaneamente com 10 mL de água filtrada. Este procedimento viabilizou a

administração da cápsula em sua forma íntegra, não possibilitando alterações na liberação e dissolução do EFZ causadas possivelmente pela mastigação.

Figura 13: Aplicador de cápsula utilizado para administração em coelhos.



Fonte: autoria própria.

5.6.3 Coletas do material biológico

Após a administração, foi realizada coleta para punções sucessivas, no volume de 500 μ L, em tubos previamente heparinizados (20 μ L de heparina Blau Farmacêutica[®]), através da artéria auricular central (Figura 12) utilizando seringas de 1 mL com agulha (13 mm x 0,33 mm) BD[®], nos tempos pre-determinados em estudos pilotos descritos a seguir:

- **GRUPO IV:** 5; 15; 20; 30; 45; 60; 90; 120; 180; 240; 360; 480; 720; 1080 e 1440 min.

- **GRUPO ORAL-IFA E ORAL-DS:** 10; 20; 30; 45; 60; 90; 120; 180; 240; 360; 480; 720; 1080 e 1440 min.

A diferença nos tempos iniciais das coletas do material biológico para os diferentes grupos, é devido ao perfil farmacocinético do fármaco quando administrado em diferentes vias, uma vez que, quando a administração é intravenosa, nós consideramos que o fármaco já está 100% biodisponível na circulação sanguínea.

O volume sanguíneo retirado dos animais, não ultrapassou os limites máximos recomendado por estudos de Diehl et al., (2001) permitindo coletas sanguíneas de até 7,5% do volume total da massa corporal, aproximadamente 15,75 mL para um animal de 3,5 kg. A coleta sanguínea ao longo do tempo, neste estudo de 24h com 15 pontos de coleta tendo um total de 7,5 mL de sangue retirado, não

altera o perfil do fármaco e não evolui o animal a um quadro clínico de hipovolemia prejudicando o seu bem-estar. Após as coletas, as amostras são condicionadas em microtubos previamente heparinizados do qual é separado o plasma após centrifugação a 1722 x g e condicionados em microtubos de 2 mL, e assim, mantidos no freezer a -20°C até a análise.

5.7 Análise Farmacocinética

A partir da construção da curva de concentração plasmática *versus* tempo o modelo monocompartimental se mostrou mais adequado para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos, uma vez que foi observada somente uma velocidade de decaimento da concentração plasmática pelo tempo. A seguir, na tabela 3, são detalhados os parâmetros farmacocinéticos avaliados neste estudo, bem como a descrição dos cálculos de cada um deles.

Tabela 3: Parâmetros farmacocinéticos avaliados.

Parâmetro	Un	Descrição	Equação
C_{máx}	µg/mL	concentração plasmática máxima	experimental
T_{máx}	min	tempo para atingir C _{máx}	experimental
K_{el}	min ⁻¹	constante de eliminação	gráfico log da concentração plasmática vs tempo
t_{1/2}	min	meia vida de eliminação	$\frac{0,693}{K_{el}}$
ASC_{0-t}	µg/mL.min	área sob a curva de zero ao último tempo quantificável	método dos trapezoides
ASC_{0-∞}	µg/mL.min	área sob a curva de zero extrapolada ao infinito	$ASC_{0-t} + \left(\frac{Cp_n}{K_{el}}\right)$
ASMC_{0-t}	µg/mL.min	área sob o momento da curva de zero ao último tempo quantificável	método da estatística dos momentos
ASMC_{0-∞}	µg/mL.min	área sob o momento da curva de zero extrapolada ao infinito	$ASMC_{0-t} + \left(\frac{Cpn \times tn}{K_{el}}\right) + \left(\frac{Cp_n}{K_{el} \times K_{el}}\right)$
Cl	mL/min/kg	<i>Clearance</i>	$\frac{Dose \times F}{ASC_{0-\infty}}$
Vd_{área}	mL/kg	volume de distribuição	$\frac{Cl}{K_{el}}$
Vc	mL/kg	volume de distribuição central	$\frac{Dose \times F}{A \text{ ou } B}$
F_{ORAL}		biodisponibilidade absoluta	$\frac{ASC_{oral} \times Dose_{i.v}}{ASC_{i.v} \times Dose_{oral}} \times 100$
MTT	min	Tempo de trânsito médio	$\frac{ASMC}{ASC_{0-\infty}}$
MRT	min	Tempo de residência médio	MTT - MAT
ka	min ⁻¹	constante de absorção	método dos resíduos
t_{1/2a}	min	meia vida de absorção	$\frac{0,693}{Ka}$
R_{áreas}		relação entre as áreas	$\frac{ASC_{0-t}}{ASC_{0-\infty}}$
MAT	min	tempo médio de absorção	1/Ka
T_{lag}	min	tempo para o início da absorção	$\frac{\ln(\text{fase absorção}/\text{fase de eliminação})}{\text{fase absorção} - \text{fase de eliminação}}$

C_{máx}: concentração plasmática máxima; T_{máx}: tempo para atingir a C_{máx}; K_{el}: constante de eliminação; T_{1/2}: meia vida de eliminação; ASC_{0-t}: área sob a curva até o último tempo quantificável; ASC_{0-∞}: área sob a curva de zero extrapolado ao infinito; Cp_n: última concentração plasmática quantificável; ASMC_{0-t}: área sob o momento da curva de zero ao último tempo quantificável; ASMC_{0-∞}: área sob o momento da curva de zero extrapolado ao infinito; t_n: último tempo da última concentração plasmática quantificável; Cl: *clearance*; Vd_{área}: volume de distribuição; Vc: volume de distribuição central F_{oral}: biodisponibilidade oral; MTT: tempo de trânsito médio; MRT: tempo de residência médio; Ka: constante de absorção; T_{1/2a}: meia vida de absorção; R_{áreas}: relação entre as áreas; MAT: tempo médio de absorção; T_{lag}: tempo para o início da absorção.

5.8 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram apresentados através das médias e medianas com intervalo de confiança de 95%. A distribuição dos resultados foi avaliada por teste de normalidade para determinar o uso de um teste t paramétrico ou não paramétrico, sendo que em ambos os casos foi utilizado um nível de significância de 0,05 para avaliar as diferenças obtidas nos parâmetros farmacocinéticos do efavirenz entre os grupos. Para análise estatística e produção de gráficos foi empregado o programa GraphPadInStat® e Prisma 5, respectivamente.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do método cromatográfico, junto com os resultados farmacocinéticos do grupo EFZ-IV e ORAL-IFA, foram realizados em parceria com a mestrandia Evelin dos Santos Martins em seu trabalho intitulado: “Farmacocinética do efavirenz administrado na forma de nanopartículas inorgânicas em coelhos”, nesta mesma instituição sob orientação da Prof^a. Dr^a. Rosângela Gonçalves Peccinini.

6.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico

O sistema cromatográfico proposto foi capaz de separar adequadamente o analito de interesse (EFZ) e o padrão interno (DZP) sem interferentes do plasma.

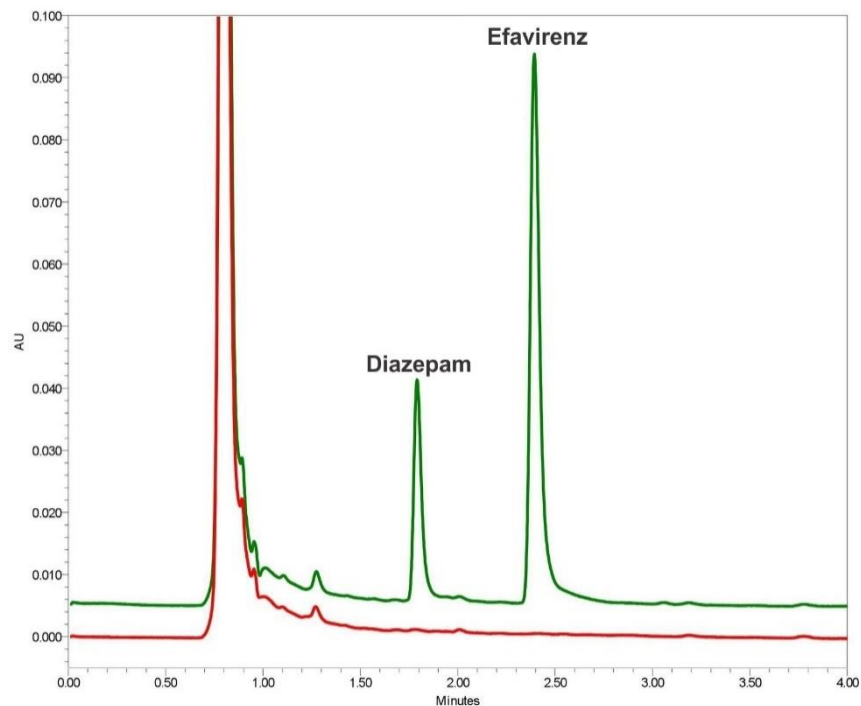
No desenvolvimento do método cromatográfico, desde o princípio, a coluna CSH foi empregada, por possuir maior afinidade por compostos que apresentam natureza básica, como é o caso do EFZ (pka 10,2). As condições cromatográficas iniciais foram baseadas no estudo de Chiappetta et al., (2011) mas sofreu alterações para melhorar a resposta do analito sob nossas condições laboratoriais.

A separação do analito se deve por adsorção junto com a fase móvel empregada na análise, que consistiu na mistura de proporções desiguais de solventes com força de eluição diferentes, sendo eles: trietilamina 0,1% com pH 4 ajustado com ácido fórmico, metanol e acetonitrila (30:20:50), operando em modo isocrático.

O emprego da trietilamina na fase móvel foi de grande importância, tendo o papel de suprimir as interações dos grupos silanóis fortemente ionizados presentes na superfície da sílica com o EFZ. Os silanóis são preenchidos pela trietilamina presente na fase móvel, não interagindo com compostos básicos e consequentemente não causando o efeito cauda no perfil cromatográfico do analito.

A figura 14 apresenta o cromatograma obtido a partir do *software Empower*^{®3}, demonstrando os tempos de retenção e intensidade do sinal gerado por cada analito.

Figura 14: Cromatograma em 245 nm do EFZ (8 µg/mL) e padrão interno (DZP 25 µg/mL) em plasma (verde) e branco (vermelho).

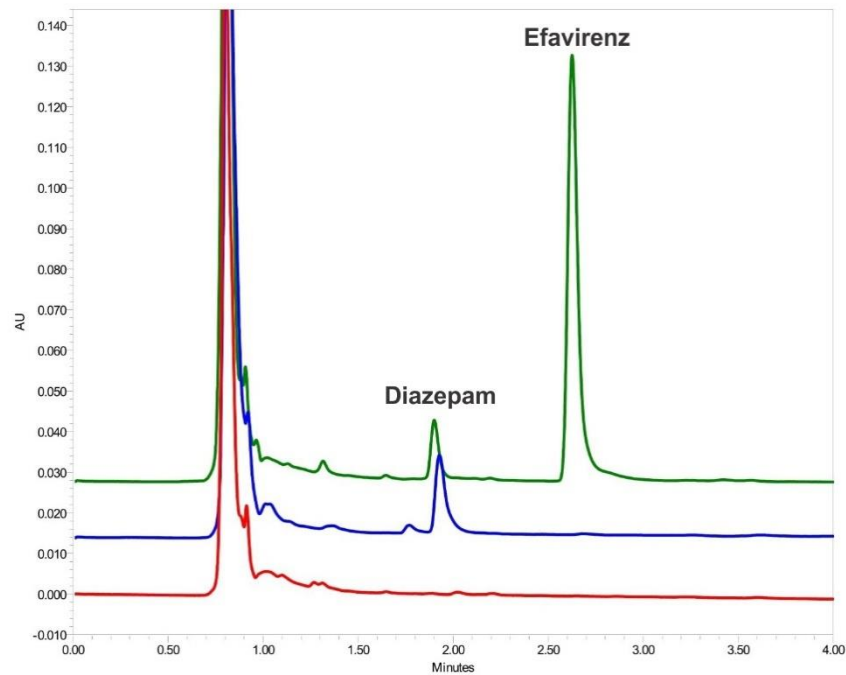


No sistema cromatográfico proposto o tempo de retenção do EFZ foi de aproximadamente 2,30 min e do DZP de 1,75 min (Figura 14), apresentando boa definição e separação entre os picos.

6.1.1 Seletividade

Com a sobreposição dos cromatogramas, demonstrado na figura 15, podemos observar que no tempo de retenção do EFZ não houve interferências do P.I utilizado e do plasma branco (isento de substâncias exógenas), características essas, que favorecem a quantificação do analito de escolha, resultando em análises cromatográficas satisfatórias.

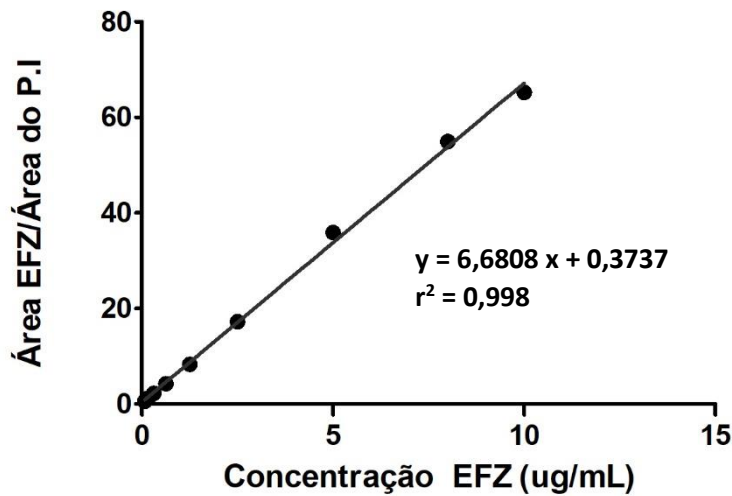
Figura 15: Cromatograma em 245 nm do EFZ (8 µg/mL) e padrão interno (DZP; 25 µg/mL) em plasma (verde); DZP (25 µg/mL) em plasma (azul) e Branco (vermelho).



6.1.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir da construção de uma curva analítica plotando a relação entre as áreas dos picos de EFZ e DZP contra a concentração nominal do EFZ. Foram preparadas soluções estoque de EFZ e DZP que posteriormente foram adicionadas a plasma branco. Foram realizadas diluições com 9 níveis de concentrações: 0,078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 8 e 10 µg/mL. A curva apresentou exatidão entre 97,5% e 110,6%, valores aceitáveis, uma vez que o critério de aceitação é de 85 a 115%, exceto para o LIQ, que pode apresentar exatidão entre 80 e 120%. A curva foi construída utilizando ponderação $1/x^2$, normalizando a tendência da reta em toda a sua amplitude e resultando em coeficiente de correlação de 0,998 e a equação da reta: $y=6,6808x+0,3737$. O LIQ, menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis, foi de 0,078 µg/mL com precisão (CV %=3,92 e exatidão 110,7%).

Figura 16: Curva bioanalítica construída para EFZ (n=3) em plasma.



Na tabela 4 estão apresentados os pontos da curva de calibração, os valores nominais para cada ponto e os resultados de precisão e exatidão.

Tabela 4: Média das concentrações experimentais que geraram a curva de calibração.

Efavirenz									
Nominal (µg/mL)	0,0781	0,1562	0,3125	0,625	1,25	2,5	5	8	10
Experimental (µg/mL)	0,0865	0,1701	0,3300	0,6175	1,22	2,5	5,3	8,1	9,6
Precisão (%)	3,9	1,8	4,9	2,3	5,3	1,2	6,6	1,9	7,6
Exatidão (%)	110,7	108,9	105,6	98,8	97,5	101,1	105,2	100,6	95,6

6.1.3 Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas a partir de cinco concentrações: LIQ (0,0781 µg/mL) CQB (0,1562 µg/mL), CQM (1,25 µg/mL), CQD (2,0 µg/mL) e CQA (8,0 µg/mL). De acordo com a RDC 27/2012 as análises para intracorrída foram determinadas por cinco replicatas do limite inferior de quantificação (LIQ), controles de qualidade baixo (CQB), média (CQM), diluído (CQD) e alto (CQA), todos realizados no mesmo dia, já para os resultados de precisão e exatidão intercorridas as determinações foram feitos em três dias consecutivos. Os resultados encontram-se na tabela 5.

Tabela 5: Precisão e exatidão dos controles de qualidade para o método bioanalítico do EFZ em plasma.

		Controle de qualidade em plasma				
		LIQ	CQB	CQM	CQD	CQA
Concentração nominal EFZ ($\mu\text{g/mL}$)		0,0781	0,1562	1,25	2	8
	n	5	5	5	5	5
Intracorrída	Precisão (%)	8,2	4,6	4,1	4,3	4,1
	Exatidão (%)	96	99,84	98,72	95,2	97,225
	n	15	15	15	15	15
Intercorrída	Precisão (%)	16,4	10,9	7,5	6,2	6,4
	Exatidão (%)	105,0	105,6	109,4	103,2	100,3

LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQD: controle de qualidade diluído; CQA: controle de qualidade alto.

Todas as concentrações supracitadas apresentaram precisão e exatidão dentro dos critérios de aceitação preconizados pela RDC 27/2012.

6.1.4 Efeito residual

Foram analisadas três injeções da mesma amostra de plasma branco (ausente de EFZ e DZP), sendo uma antes e duas logo após a injeção da amostra processada do limite superior de quantificação (LSQ = 10 $\mu\text{g/mL}$). A resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito foram inferiores a 20% da resposta do LIQ e as respostas de picos interferente no tempo de retenção do P.I foram inferiores a 5% da resposta do DZP. Com esses resultados podemos concluir que não foi evidenciado aumento de sinal por “contaminação” de amostras anteriores, tanto para o EFZ quanto para o DZP, sendo assim descartada a chance do efeito residual.

6.1.5 Recuperação

A recuperação do método foi avaliada por meio de análise em triplicata de amostras de plasma contendo EFZ em três concentrações: CQB (0,01562 $\mu\text{g/mL}$), CQM (1,25 $\mu\text{g/mL}$) e CQA (8,0 $\mu\text{g/mL}$).

Para determinar a porcentagem de recuperação do método, foi realizada a comparação dos resultados obtidos com amostras de plasma contendo os fármacos

submetidos ao processo de extração e amostras dos fármacos em fase móvel, nas mesmas condições.

Porcentagens de recuperação do analito e padrão interno próximas a 100% são desejáveis, porém, valores inferiores são considerados, desde que, a recuperação seja precisa e exata (tabela 6).

Tabela 6: Ensaio da recuperação das três triplicatas do controle de qualidade.

Controles de qualidade	Recuperação %	CV(%)
CQB	60,48	1,64/13,64
CQM	83,82	2,61/10,62
CQA	83,87	0,81/14,21

CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto.

Para esse método a recuperação média foi 76,06%. Embora o resultado de recuperação seja bem inferior a 100%, os parâmetros de exatidão e precisão ficaram dentro dos limites aceitáveis e demonstram que o processamento é adequado para a extração do EFZ em plasma. Para melhorar esse resultado, uma das medidas que pode ser adotada é o emprego de coluna em fase sólida, porém, é importante ressaltar que a utilização dessa técnica torna o processamento das amostras mais longo.

6.1.6 Estabilidade de armazenamento

A estabilidade das amostras utilizadas deve ser avaliada nos diferentes intervalos de tempo para determinar se o analito empregado não sofreu alterações químicas em matriz biológica sob condições específicas do seu processamento. Todas as estabilidades preconizadas pela RDC 27/2012 foram avaliadas empregando-se o controle de qualidade baixo (CQB) e alto (CQA) em triplicata. As amostras foram consideradas instáveis quando se verificou desvio superior a 15% em relação ao valor obtido em amostras recém-preparadas.

6.1.6.1 Estabilidade de Curta Duração (ECD)

Para avaliar a estabilidade de curta duração, as amostras plasmáticas devem permanecer a temperatura ambiente em um período de tempo baseado no mesmo tempo em que serão mantidas antes da extração e análise.

As amostras de plasma contendo o fármaco foram descongeladas e mantidas a temperatura ambiente por 6 h, onde o fármaco apresentou coeficiente de variação (CV) abaixo de 15% em relação a concentração inicial, indicando estabilidade.

6.1.6.2 Estabilidade de Longa Duração (ELD)

O tempo de armazenamento das amostras de plasma em freezer para o estudo de estabilidade de longa duração deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última.

Após preparo das amostras de CQA e CQB, elas foram congeladas a -20°C por 27 dias, quando analisadas, precisão e exatidão se apresentaram dentro dos valores preconizados, determinando a estabilidade.

6.1.6.3 Estabilidade Pós-Processamento (EPP)

Como o equipamento de cromatografia líquida que foi empregado para a quantificação dos analitos possui sistema automático de injeção, as amostras de plasma processadas juntamente com o P.I, devem ser avaliadas enquanto a sua estabilidade pelo período de tempo superior a duração das corridas analíticas do conjunto de amostras.

Os controles CQA e CQB foram processados e analisados juntamente com uma curva de calibração, após a corrida que durou aproximadamente 6 h, as amostras que foram mantidas no auto sampler sob temperatura de 10°C , foram reanalisadas. Os resultados demonstraram que o coeficiente de variação estava acima de 15%, indicando instabilidade. Então o ensaio foi repetido, mas para um período de 3 h, resultando em valores aceitáveis, esse resultado sugeriu que a execução das análises só poderia ser realizada de dois animais por vez.

6.1.6.4 Estabilidade após ciclo de Congelamento/Descongelação (ECCD)

Esta análise avalia a estabilidade dos analitos após a amostra plasmática sofrer três ciclos de congelamento e descongelamento. As amostras de CQA e CQB foram congeladas a -20°C por 24 h então foram descongeladas até atingir temperatura ambiente e então congeladas por mais 24h, esse procedimento foi repetido mais uma vez, sendo as amostras analisadas ao final do terceiro descongelamento e comparadas com aquelas obtidas em amostras recém-preparadas.

A precisão e exatidão apresentadas foram menores que 15%, indicando estabilidade da amostra até mesmo quando submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento, esse resultado nos permite inferir que após o descongelamento da amostra a mesma pode ser congelada novamente.

Todos os resultados das estabilidades estão expressos na tabela 7 a seguir:

Tabela 7: Estabilidade do EFZ sob condições de armazenamento e processamento em plasma

		Estabilidade de armazenamento			
		ECD	ELD	EPP	ECCD
CQB (0,1562 $\mu\text{g/mL}$)	n=3				
	Exatidão (%)	102,08	102,08	105,44	114
	Precisão(%)	12,3	9,14	4,99	1,47
CQA (8 $\mu\text{g/mL}$)	n=3				
	Exatidão (%)	101,84	102,14	106,39	91,45
	Precisão(%)	7,23	5,22	4,42	6,28

ECD: estabilidade de curta duração; ELD: estabilidade de longa duração; EPP: estabilidade pós-processamento; ECCD: estabilidade após ciclo de congelamento/descongelação.

6.2 Avaliação Farmacocinética

6.2.1 Grupo Farmacocinético I – GRUPO EFZ IV

Os animais desse grupo receberam administração dose única de EFZ 2,7 mg/kg na veia marginal auricular (IV *bolus* - aproximadamente 1 minuto). Após as análises das amostras coletadas nos tempos determinados no protocolo

experimental desse estudo, foi construída a curva de concentrações plasmáticas *versus* tempo e, assim, calculados os parâmetros farmacocinéticos apresentados na tabela 9.

A seguir a tabela 8 apresenta os valores médios e seus respectivos desvios padrões das concentrações plasmáticas *versus* tempo obtidos.

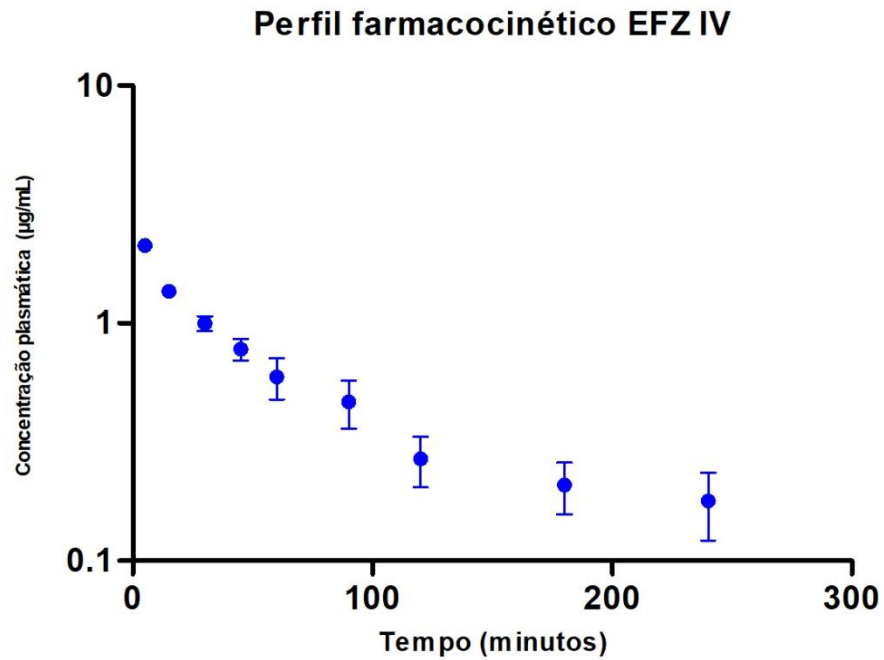
Tabela 8: Valores das concentrações plasmáticas de EFZ *versus* tempo na administração de EFZ IV *bolus* em coelhos (n=7).

Tempo (min)	Média das concentrações plasmáticas (n=7) + (\pm DP) $\mu\text{g/mL}$
5	2,1233 (0,0677)
15	1,3463 (0,2121)
30	0,9843 (0,1881)
45	0,7573 (0,2035)
60	0,5471 (0,3086)
90	0,4259 (0,2638)
120	0,2315 (0,1709)
180	0,1829 (0,1260)
240	0,1537 (0,1269)

DP = Desvio padrão

Através das concentrações médias apresentadas anteriormente, o gráfico com o perfil cinético foi construído (gráfico 1) o que nos levou a concluir que o modelo monocompartimental seria o mais adequado para obtenção dos parâmetros farmacocinéticos devido à presença de apenas uma velocidade de eliminação.

Gráfico 1: Perfil farmacocinético do EFZ administrado por IV *bolus*. (média \pm DP, n = 7).



Analisando as barras de erro (gráfico 1), podemos verificar que as concentrações plasmáticas entre os animais sofreram pouca variação e outro ponto importante é que quanto mais o tempo de estudo passa, a variabilidade das concentrações aumenta, esse resultado é devido a menores concentrações do fármaco do organismo junto com a variabilidade fisiológica intrínseca de cada animal em metabolizar e eliminar o fármaco.

Foram obtidas amostras de sangue até o tempo de 1440 min, porém, não foi possível sua quantificação após o tempo 4 h, devido à ausência de concentrações detectáveis pelo método cromatográfico.

Tabela 9: Parâmetros farmacocinéticos do EFZ a partir da administração IV *bolus* (n = 7, média ± IC95).

Parâmetro	Unidade	Média
K_{el}	min ⁻¹	0,0132 (0,0081 – 0,0182)
$t_{1/2}$	min	60,85 (36,81 – 84,90)
ASC 0-∞	µg/mL.min	133,45 (76,87 – 190,02)
Cl	mL/min/kg	22,64 (16,68 – 28,60)
Vd _{área}	mL/kg	1791,86 (1485,8 – 2097,9)
Vc	mL/kg	1826,89 (1512,8 – 2,141)
MRT	min	87,81 (53,11 – 122,51)

K_{el} : constante de eliminação; $T_{1/2}$: meia vida de eliminação; $ASC_{0-\infty}$: área sob a curva de zero extrapolado ao infinito; Cl: *clearance*; Vd_{área}: volume de distribuição; Vc: volume de distribuição central; MRT: tempo de residência médio.

6.2.2 Grupo Farmacocinético II – GRUPO EFZ ORAL- IFA

Os animais desse grupo receberam administração dose única de cápsulas contendo EFZ sem adição dos excipientes. Na formulação comercial, a cápsula de 50 mg apresenta celulose microcristalina, lactose monoidratada, croscarmelose sódica, hiprolose, laurilsulfato de sódio, estearato de magnésio, opadry yellow (polietilenoglicol, hipromelose, dióxido de titânio, óxido de ferro amarelo). Após as análises das amostras coletadas nos tempos determinados no protocolo experimental, foi construída a curva de concentrações plasmáticas *versus* tempo e, assim, calculados os parâmetros farmacocinéticos apresentados na tabela 11.

Os valores médios e desvios padrões das concentrações plasmáticas em seus respectivos tempos deste grupo, estão representados na tabela 10 a seguir:

Tabela 10: Valores das concentrações plasmáticas de EFZ *versus* tempo na administração de EFZ – IFA cápsulas em coelhos (n=6).

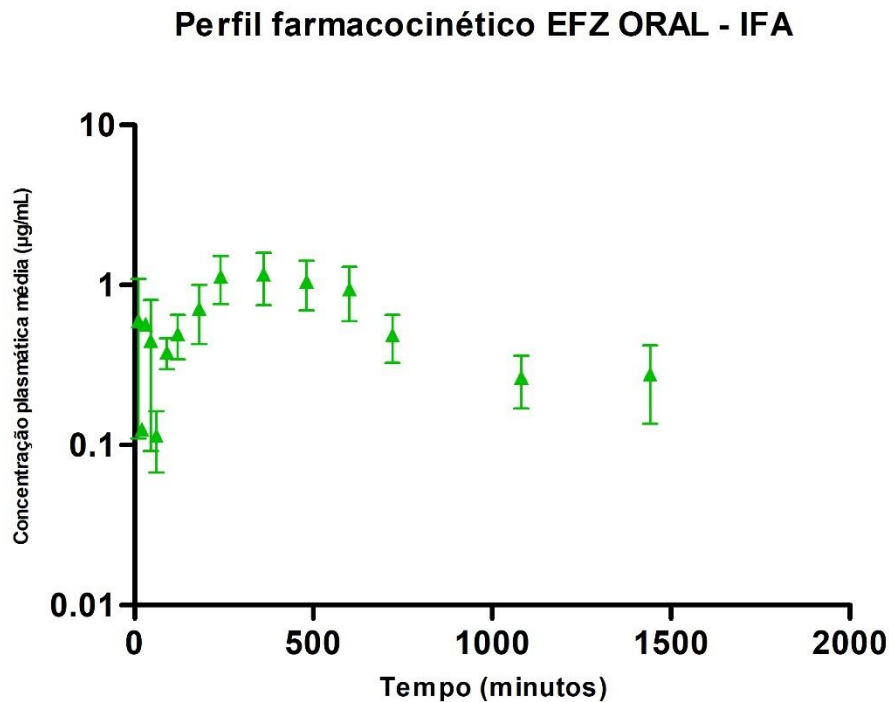
Tempo (min)	Média das concentrações plasmáticas (n=6) + (\pm DP) μ g/mL
10	0,6014 (0,6949)
20	0,1253 *
30	0,5689 *
45	0,4494 (0,5053)
60	0,1149 (0,0950)
90	0,3817 (0,1863)
120	0,4969 (0,3432)
180	0,7156 (0,7052)
240	1,1403 (0,9290)
360	1,6978 (1,0360)
480	1,0567 (0,8864)
600	0,9460 (0,7874)
720	0,4886 (0,3229)
1080	0,2652 (0,1925)
1440	0,2782 (0,2456)

DP = Desvio padrão

* Valores do desvio padrão não foram obtidos, pois a concentração nesse tempo só foi evidenciada em um animal do grupo.

Através das concentrações médias mostradas anteriormente o gráfico com o perfil cinético foi construído (gráfico 2) o que nos levou a concluir que o modelo monocompartimental é o mais adequado para obtenção dos parâmetros farmacocinéticos, pois não foi observado duas velocidades de decaimento na fase da eliminação o que caracterizaria modelo bicompartmental.

Gráfico 2: Perfil cinético do EFZ – IFA administrado por via oral. (média ± DP, n = 6).



A alta variabilidade nas concentrações plasmáticas demonstrada no gráfico através da barra de erros, condiz com valores encontrados por Csajka et al., (2003), que encontrou valores diferentes inter e intraindividual de 54,6% e 26%, respectivamente, em humanos que receberam EFZ na dose de 600 mg (oral).

Diante dessa alta variabilidade, a monitorização terapêutica dos níveis plasmáticos de EFZ é recomendada para evitar efeitos adversos e principalmente a descontinuação do tratamento (CHIAPPETTA et al., 2011). No entanto, ressaltamos que este perfil foi obtido com a administração do IFA, sem a presença de excipientes que estão contidos na formulação comercial. A presença desses excipientes na formulação comercial pode diminuir a variabilidade nas concentrações plasmáticas.

As concentrações plasmáticas do EFZ foram observadas 7 h após administração, valores semelhantes aos encontrados por Chowdary e Enturi (2013), 4 h após a administração de doses 10 mg/kg, por via oral em coelhos. Essa diferença pode ser justificada devido à utilização do EFZ na sua forma livre, sem qualquer adição de excipientes.

A utilização do EFZ na forma de insumo farmacêutico ativo foi escolhida devido ao fato de que a DS ainda está em fase de teste e passará por processos

farmacotécnicos de sua complexação para o desenvolvimento da forma farmacêutica final.

Tabela 11: Parâmetros farmacocinéticos do EFZ a partir da administração Oral da cápsula (n = 6, média ± IC95).

Parâmetro	Unidade	Média
K_{el}	min^{-1}	0,0022 (0,0006 – 0,004)
$t_{1/2}$ eliminação	min	624,28 (2,754 – 1245,8)
K_a	min^{-1}	0,0037 (0,0009 – 0,0065)
$t_{1/2}$ absorção	min	290-72 (65,22 – 516,22)
ASC 0- ∞	$\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$	1106,42 (394,99 – 1817,9)
Cl	$\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$	29,76 (16,85 – 52,66)
$V_{d\text{área}}$	mL/kg	20517,97 (2441 – 38595)
V_c	mL/kg	16460 (2903,8 – 35824)
MTT	min	900,84 (398 – 1797,7)
F		1,34 (0,50 – 2,19)
C_{max}	$\mu\text{g}/\text{mL}$	1,46 (0,50 – 2,41)
T_{max}	min	370 (254,45 – 485,55)
MAT	min	419,50 (94,11 – 744,90)
MRT	min	677,18 (-78,64 – 1433)
T_{lag}	min	0,75 (-0,092 – 1,59)

K_{el} : constante de eliminação; $T_{1/2}$: meia vida de eliminação; K_a : constante de absorção; $T_{1/2a}$: meia vida de absorção; $ASC_{0-\infty}$: área sob a curva de zero extrapolado ao infinito; Cl: *clearance*; V_d : volume de distribuição; V_c : volume de distribuição central; MRT: tempo de residência médio; F_{oral} : biodisponibilidade oral; $C_{\text{máx}}$: concentração plasmática máxima; $T_{\text{máx}}$: tempo para atingir a $C_{\text{máx}}$; MAT: tempo médio de absorção; MTT: tempo de trânsito médio; T_{lag} : tempo para o início da absorção.

6.2.3 Grupo Farmacocinético III – GRUPO EFZ ORAL-DS

Os animais desse grupo receberam administração dose única de cápsulas contendo EFZ carregado por dispersão sólida na concentração de 50 mg pela via oral. Após as análises das amostras coletadas nos tempos determinados no protocolo experimental desse estudo, foi construída a curva de concentrações plasmáticas *versus* tempo e, assim, calculados os parâmetros farmacocinéticos apresentados na tabela 13.

A seguir a tabela 12 apresenta os valores médios e seus respectivos desvios padrões das concentrações plasmáticas *versus* tempo obtidos.

Tabela 12: Valores das concentrações plasmáticas de EFZ *versus* tempo na administração de cápsulas contendo EFZ carregado pela dispersão sólida (média, n=7).

Tempo (min)	Média das concentrações plasmáticas (n=6) + (\pm DP) μ g/mL
10	0,0342 (0,0346)
20	0,0489 (0,0274)
30	0,1528 (0,1007)
45	0,3914 (0,3084)
60	0,6494 (0,4105)
90	0,8818 (0,4867)
120	1,0865 (0,5861)
180	1,2901 (0,7644)
240	1,1985 (0,5259)
360	1,0059 (0,3559)
480	0,9819 (0,6603)
600	0,8349 (0,6723)
720	0,6153 (0,5637)
1080	0,3199 (0,3834)
1440	0,2205 (0,2183)

DP = Desvio padrão

Através das concentrações médias mostradas anteriormente o gráfico com o perfil cinético foi construído (gráfico 3) o que nos levou a concluir que o modelo monocompartimental seria o mais adequado para obtenção dos parâmetros farmacocinéticos devida à ausência de duas velocidades na fase de eliminação.

Gráfico 3: Perfil cinético do EFZ carregado pela dispersão sólida administrado por via. oral (média \pm DP, n = 7).

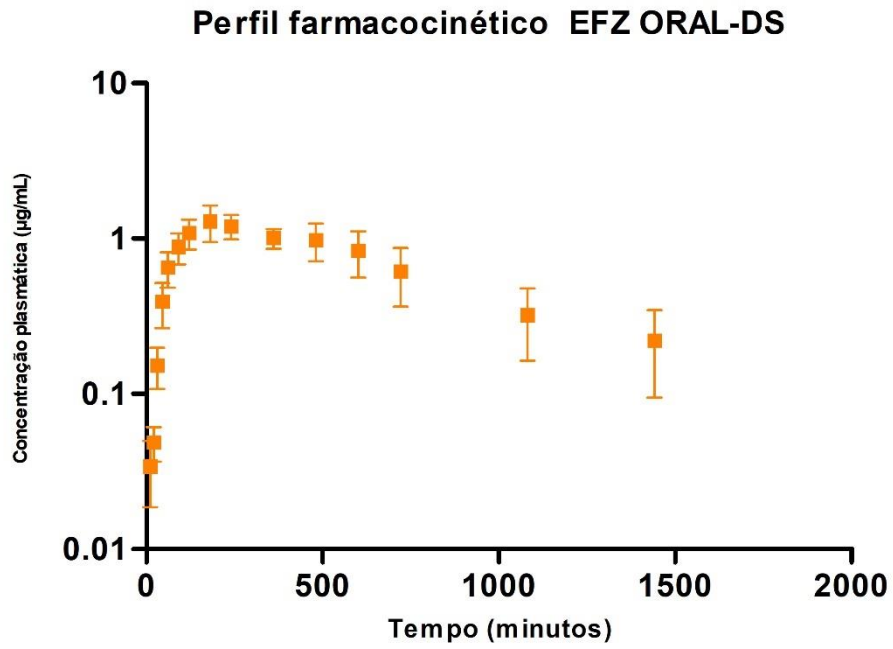


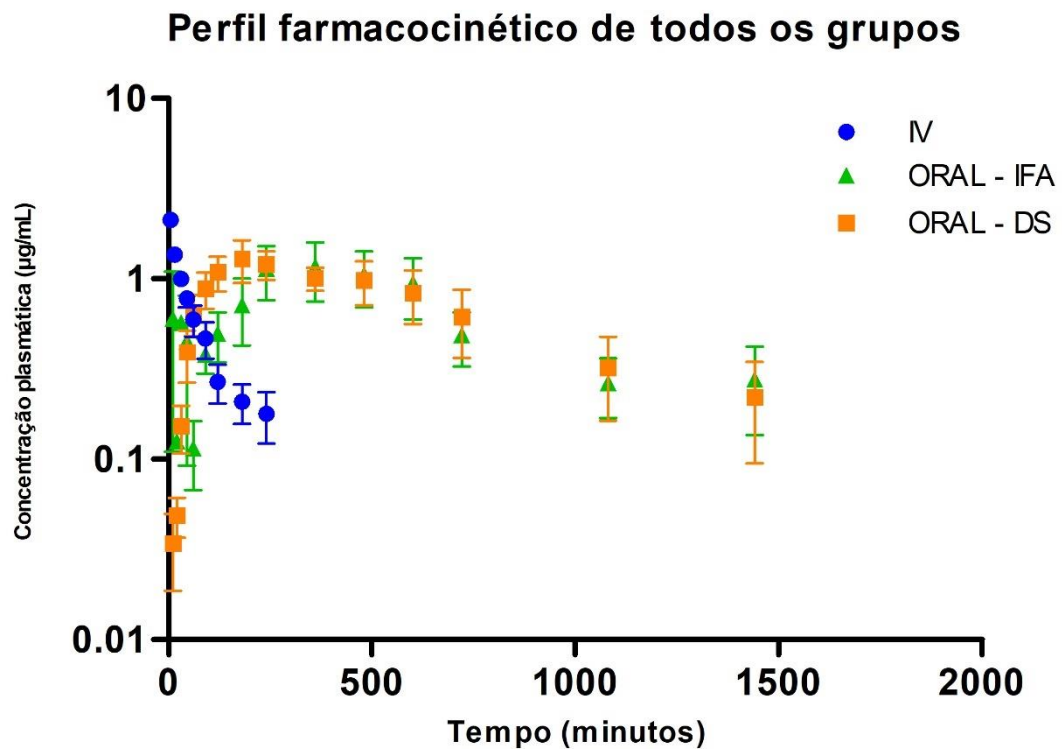
Tabela 13: Parâmetros farmacocinéticos do EFZ a partir da administração oral da cápsula contendo o fármaco carregado pela dispersão sólida (n = 7, média ± IC95).

Parâmetro	Unidade	Média
K_{el}	min ⁻¹	0,0025 (0,0013 – 0,0036)
$t_{1/2}$ eliminação	min	373-,38 (173,13 – 573,64)
K_a	min ⁻¹	0,0083 (0,0045 – 0,012)
$t_{1/2}$ absorção	min	117,57 (36,62 – 198,52)
ASC 0-∞	µg/mL.min	1026,66 (510,41 – 1542,9)
Cl	mL/min/kg	21,75 (16,21 – 27,29)
Vd _{área}	mL/kg	11597,19 (4068,8 – 19126)
Vc	mL/kg	8968,88 (1835,4 – 16102)
MTT	min	663,81 (367,61 – 960,00)
F		1,13 (0,70 – 1,57)
C _{max}	µg/mL	1,66 (0,92 – 2,39)
T _{max}	min	240 (115,91 – 364,09)
MAT	min	169,66 (52,85 – 286,47)
MRT	min	613,20 (219,51 – 1006,9)
T _{lag}	min	0,48 (0,057 – 0,91)

K_{el} : constante de eliminação; $T_{1/2}$: meia vida de eliminação; K_a : constante de absorção; $T_{1/2a}$: meia vida de absorção; ASC_{0-∞}: área sob a curva de zero extrapolado ao infinito; Cl: *clearance*; Vd_{área}: volume de distribuição; Vc: volume de distribuição central; MRT: tempo de residência médio; F_{oral}: biodisponibilidade oral; C_{máx}: concentração plasmática máxima; T_{máx}: tempo para atingir a C_{máx}; MAT: tempo médio de absorção; MTT: tempo de trânsito médio; T_{lag}: tempo para o início da absorção.

6.3 Comparação estatística e interpretação dos resultados

No gráfico 4 foram inseridas as curvas das concentrações plasmáticas pelo tempo dos três grupos avaliados e na tabela 14 estão apresentados todos os parâmetros farmacocinéticos obtidos na análise farmacocinética de cada grupo, com identificação correspondente às comparações estatísticas entre eles. No apêndice estão dispostos os resultados individuais para todos os grupos de animais avaliados neste estudo.

Gráfico 4: Perfil farmacocinético dos grupos: IV; ORAL-IFA e ORAL-DS.

(média \pm DP, n = 21)

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação estatística entre todos os grupos, teste este melhor indicado para a comparação entre 3 ou mais grupos experimentais, já para a comparação estatística dos grupos orais foi aplicado o teste Mann Whitney.

Os grupos ORAL-IFA e ORAL-DS não apresentaram diferenças estatísticas significativas em nenhum parâmetro farmacocinético quando comparados entre si, demonstrando que os diferentes produtos administrados apresentam comportamento semelhante neste modelo animal.

Tabela 14: Comparação estatística dos parâmetros farmacocinéticos do EFZ nas diferentes formulações (média + CV%).

Parâmetro	Unidade	EFZ IV	EFZ ORAL-IFA	EFZ ORAL-DS
K_{el}	min ⁻¹	0,0132 (41,36%)	0,0022* (67,90%)	0,0025* (52,22%)
$t_{1/2}$ eliminação	min	60,85 (42,73%)	624,28* (94,85%)	373,38* (57,99%)
K_a	min ⁻¹	-	0,0037 (73,19%)	0,0083 (49,53%)
$t_{1/2}$ absorção	min	-	290,72 (73,90)	117,57 (74,44%)
ASC 0-∞	µg/mL.min	133,45 (45,84%)	1106,42* (61,26%)	1026,66* (54,37%)
Cl	mL/min/kg	22,64 (28,45%)	29,76* (73,33%)	21,75* (27,55%)
V _d área	mL/kg	1791,86 (18,47%)	20517,97* (83,93%)	11597,19* (70,18%)
V _c	mL/kg	1826,89 (18,59%)	16460* (112,08%)	8968,88* (85,99%)
MTT	min	87,81 (42,73%)	900,84* (94,85%)	663,81* (48,25%)
F	-	-	1,34 (59,79%)	1,13 (41,67%)
C _{max}	µg/mL	-	1,46 (62,69%)	1,66 (48,20%)
T _{max}	min	-	370 (29,75%)	240 (55,90%)
MAT	min	-	419,50 (73,90%)	169,66 (95,45%)
MRT	min	87,81 (42,73%)	677,18* (106,34%)	613,20* (69,42%)
T _{lag}	min	-	0,75 (107,07%)	0,48 (95,45%)

*p<0,05 quando comparado ao grupo EFZ IV

CV % = coeficiente de variação [(desvio padrão/média) x 100]

K_{el} : constante de eliminação; $T_{1/2}$: meia vida de eliminação; K_a : constante de absorção; $T_{1/2a}$: meia vida de absorção; ASC_{0-∞}: área sob a curva de zero extrapolado ao infinito; Cl: *clearance*; V_d: volume de distribuição; V_c: volume de distribuição central; MRT: tempo de residência médio; F_{oral}: biodisponibilidade oral; C_{máx}: concentração plasmática máxima; T_{máx}: tempo para atingir a C_{máx}; MAT: tempo médio de absorção; MTT: tempo de trânsito médio; T_{lag}: tempo para o início da absorção.

Quando comparados, os grupos que receberam administração oral em relação ao grupo que recebeu administração IV *bolus*, foi possível observar diferenças estatísticas em todos os parâmetros farmacocinéticos. Esse resultado condiz com o fato que na administração intravenosa não ocorre o processo de absorção, e os processos de distribuição e eliminação ocorrem prontamente. Na administração extravascular, particularmente na administração oral de ativos de baixa solubilidade, há grande impacto do processo de absorção nos parâmetros farmacocinéticos relacionados aos processos de distribuição e eliminação. Este

impacto significativo é função da variabilidade e velocidade limitada da absorção do ativo, como é o caso do Efavirenz.

A avaliação da relação entre as ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ resultou valores superiores a 80%, indicando que o desenho experimental proposto foi adequado para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos, os resultados estão dispostos no apêndice 1, 2 e 3.

A constante de eliminação (K_{el}) representa a quantidade (em partes) do fármaco que está sendo removida do organismo por unidade de tempo, expressando a eficiência do processo de eliminação quando a distribuição já está em equilíbrio. O valor encontrado para o grupo IV foi de $0,132 \text{ min}^{-1}$, isso significa que a cada minuto 1,32% do EFZ está sendo eliminado. Para os grupos ORAL-IFA e ORAL-DS, o valor encontrado da constante de eliminação foi de aproximadamente $0,002 \text{ min}^{-1}$, e não apresentaram diferença estatística significativa entre si, significando que a cada minuto cerca de 0,2% do fármaco está sendo eliminado. As diferenças observadas no parâmetro constante de eliminação entre os grupos IV e oral são consequência da influência do processo de absorção sobre o perfil de decaimento das concentrações plasmáticas na administração oral. Conforme anteriormente descrito, a baixa solubilidade do EFZ é o fator de maior importância para que ocorra influência do processo de absorção sobre parâmetros de eliminação.

A meia vida de eliminação no grupo IV foi de aproximadamente 60 min, semelhante ao valor encontrado por Balani et al., (1998) que avaliou o perfil farmacocinético do EFZ em ratos com administração IV na dose de 2 mg/kg com meia vida de eliminação de 48 min. Entretanto, na administração de 1 mg/kg IV em macacos, no mesmo estudo, a meia vida de eliminação relatada foi de 156 min, evidenciando a variabilidade interespecies. A meia vida é um parâmetro farmacocinético híbrido, que sofre influência do volume de distribuição e do *clearance* e fatores como composição corporal, débito cardíaco e taxa metabólica, tão distintos entre estes modelos, devem causar significativo impacto sobre os parâmetros farmacocinéticos de distribuição e eliminação, com impacto sobre os valores de meia vida de eliminação. A meia vida de eliminação do grupo ORAL-IFA e ORAL-DS foram de 624,28 e 373,38 min, respectivamente, e não apresentaram diferença estatística significativa, ou seja, a eliminação do fármaco não foi alterada na administração dos diferentes produtos e, desta forma, podemos inferir que a

modificação do produto administrado não apresentou impacto sobre o processo de eliminação do fármaco.

É de conhecimento que o *clearance* é influenciado por dois fatores fisiológicos, sendo eles perfusão sanguínea do órgão eliminador e a capacidade inerente deste órgão em efetivar a eliminação do fármaco.

A perfusão sanguínea está diretamente ligada ao débito cardíaco (DC), sendo este definido como a quantidade de volume sanguíneo ejetado pelo coração em litros/minuto. Os principais órgãos depuradores do organismo são o fígado e os rins, que recebem 50% desse volume. Desse modo, o valor máximo de *clearance* para um fármaco - se considerarmos que o tecido hepático e os rins são os principais órgãos eliminadores e não possuem qualquer disfunção fisiológica – corresponderá à metade do DC. Qualquer valor acima de DC encontrado evidencia metabolização e/ou excreção por outros órgãos. A interpretação de Cl também se baseia na porcentagem de depuração de um fármaco que está ocorrendo através de uma única passagem pelos diferentes órgãos depuradores, expressado pelo cálculo de taxa de extração (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004b).

Equação 1: Cálculo do débito cardíaco

$$DC \text{ (mL/min/kg)} = 180 X m \text{ (kg)}^{-0,19}$$

Equação 2: Cálculo de extração corporal

$$E = \frac{Cl}{DC}$$

Considerando coelhos neozelandeses, com peso médio de 2,8 kg, o DC encontrado foi de 148 mL/kg/min e aplicando esse valor na equação 2, encontrou-se uma taxa de extração para o EFZ para o grupo IV, ORAL-IFA e ORAL-DS de 0,15,

0,20 e 0,15 respectivamente, portanto, pode-se concluir, segundo valores de referências de Toutain; Bousquet-Mélou (2004b) que o CI apresentado por esse modelo animal é considerado mediano.

Através dos resultados da média global, encontramos o volume de distribuição para o grupo IV de 1,8 L/kg, 20,5 L/kg para ORAL-IFA e 11,6 L/kg ORAL-DS. Considerando que o volume sanguíneo total dos coelhos, baseado nos estudos de Diehel et al., (2001) é de aproximadamente 160 mL, é possível inferir que o EFZ possui alta distribuição. Porém esse fenômeno não caracteriza que houve grande espalhamento do fármaco nos órgãos e tecidos, e sim evidencia o acúmulo extravascular, podendo o fármaco estar concentrado em partes distintas do corpo. As diferenças encontradas no parâmetro volume de distribuição do grupo IV com os grupos orais confirma a importância da baixa solubilidade do EFZ e suas consequências sobre a absorção influenciando os processos de distribuição.

Também neste estudo foi avaliado o V_c – volume de distribuição central – e foi observado diferença estatística do grupo IV em relação aos grupos orais, resultado este esperado devido a forma de administração, outra avaliação foi a comparação entre o V_c e $V_{d\text{área}}$ intragrupo, do qual não houve diferença significativa, portanto, podemos concluir que a velocidade de distribuição é rápida e esse processo atinge o equilíbrio entre os compartimentos da mesma forma, caracterizando um comportamento monocompartimental.

É importante ressaltar que a baixa solubilidade do EFZ tem forte impacto sobre os parâmetros V_d e meia vida, mas não sobre o parâmetro CI. Segundo Toutain & Bousquet-Melou (2004b) o CI é um dos parâmetros farmacocinéticos mais robustos e alterações de CI, em geral, somente são evidenciadas em situações de significativa modificação de débito cardíaco, funcionalidade hepática e renal ou também conforme o principal mecanismo de eliminação do fármaco em questão. Alterações de extensão ou velocidade de absorção apresentam pouco ou nenhum impacto sobre este parâmetro.

O tempo de residência médio - MRT é o tempo médio em que o fármaco reside no organismo, e é um parâmetro farmacocinético que sofre influência da via de administração escolhida e da forma farmacêutica utilizada, levando em consideração todos os processos farmacocinéticos envolvidos, com exceção da absorção. Neste contexto, espera-se que o MRT pode ser prolongado se o processo de absorção for limitante, como é o caso do EFZ, por essa razão o MRT é maior no

grupo oral (GRAHAM; HARRIS; LAU, 2001). Os valores de MRT obtidos foram: 87,81 min, 677,18 min e 613,20 min, para o grupo IV, ORAL-IFA e ORAL-DS, respectivamente. Embora não observada a diferença estatística entre os valores obtidos para os grupos ORAL-IFA e ORAL-DS, as diferenças significativas do MRT para os grupos oral com o grupo IV são esperadas.

Já o tempo de trânsito médio - MTT é o tempo de transito médio após a administração de fármaco em qualquer via. Desse modo, ele representa o tempo médio que uma molécula gasta no corpo desde o início da absorção até a conclusão de sua eliminação. Para a via de administração IV o $MRT=MTT$, entretanto, após administração extravascular, o MRT é a subtração do MTT e MAT. Assim o tempo de absorção médio - MAT representa o tempo médio para que ocorra a absorção, recurso matemático utilizado para avaliação da absorção de um fármaco a partir de diferentes formulações. Os valores de MTT e MAT para os dois grupos orais não apresentaram diferença estatística, confirmando que o processo de absorção não sofreu influência da DS.

Após a administração de fármacos pela via extravascular, a dose da substância não se encontra imediatamente biodisponível, e o atraso entre a administração e a ocorrência de concentrações quantificáveis no plasma é conhecido como "lag time ou Tlag". Este tempo é influenciado por características da formulação (desintegração, dissolução, etc.) e o poder inerente da substância em ser absorvida pela parede gastrointestinal. Este parâmetro é fundamental para avaliar formulações farmacêuticas específicas, como por exemplo, formulações de revestimento entérico ou de liberação prolongada, onde o objetivo principal é estimar a taxa da liberação controlada do fármaco. O Tlag sofre influência da ingestão de alimentos e motilidade gástrica, que contribuiriam no atraso e na extensão da taxa de fármaco absorvido. (CAWELLO, 2003). Conforme os valores descritos na tabela 14 o Tlag não influenciou na absorção da DS quando comparada ao insumo farmacêutico ativo.

A avaliação do perfil farmacocinético do EFZ administrado pela via endovenosa permitiu o cálculo da biodisponibilidade oral após administração das cápsulas de EFZ. Os resultados obtidos para biodisponibilidade do grupo ORAL-IFA e ORAL-DS foram de 1,34 e 1,13, respectivamente.

No estudo de Mukonzo et al., (2011) a biodisponibilidade oral do EFZ foi avaliada através da administração de comprimidos de 600 mg em pacientes com

AIDS, e o valor obtido foi de 0,7. Este valor pode ser decorrente das diferenças fisiológicas interespecies. Além destas diferenças fisiológicas, a biodisponibilidade oral de um fármaco sofre influência da forma farmacêutica administrada, plenitude estomacal, tempo de esvaziamento gástrico, período do movimento motor migrante, movimento de mistura do trato digestório, presença e qualidade do alimento no momento da administração do medicamento e solubilidade e permeabilidade do fármaco. Considerando que o EFZ apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade (SCB II), o fator limitante de sua absorção é a taxa de dissolução do ativo a partir da formulação administrada. A presença de coadjuvantes, por exemplo, pode auxiliar na solubilização, assim como a utilização de sistemas facilitadores da solubilidade, como emulsões, microemulsões ou nanopartículas. Além dos sistemas microparticulados, o sistema EFZ-DS promoveu um evidente incremento da solubilidade do IFA, o que pode ser explicado pelo aumento da biodisponibilidade em relação ao estudo de Mukonzo et al., (2011).

O sistema digestório de coelhos é caracterizado por uma extensa secreção de bile, cuja função principal é a de solubilizar compostos de baixa solubilidade em água, incrementando a formação de dispersões moleculares que permearão as membranas biológicas para que, então, ocorra a permeação transmembrana e absorção do ativo. Esta característica do trato digestório de coelhos, além de outras como esvaziamento gástrico, certamente tem impacto significativo sobre a alta biodisponibilidade do EFZ observada neste estudo.

Outro aspecto relevante da biodisponibilidade oral avaliada neste estudo é a variabilidade dos resultados encontrada no grupo que recebeu o insumo farmacêutico ativo sem carregamento por dispersão sólida, tendo como resultado 18,12% a mais de variabilidade intra animal em relação ao grupo ORAL-DS.

A biodisponibilidade absoluta expressa a extensão da absorção do fármaco, mas aspectos relacionados também à velocidade de absorção são de igual relevância para o desfecho clínico observado após a administração de um medicamento.

Como citado anteriormente, a constante de absorção - K_a - caracteriza o processo de penetração da substância na circulação sanguínea sofrendo influência da concentração do fármaco, fluxo sanguíneo no local de administração, superfície de contato da substância administrada, forma farmacêutica, propriedades físico-químicas, vias de administração e variabilidade individual. E através da K_a podemos

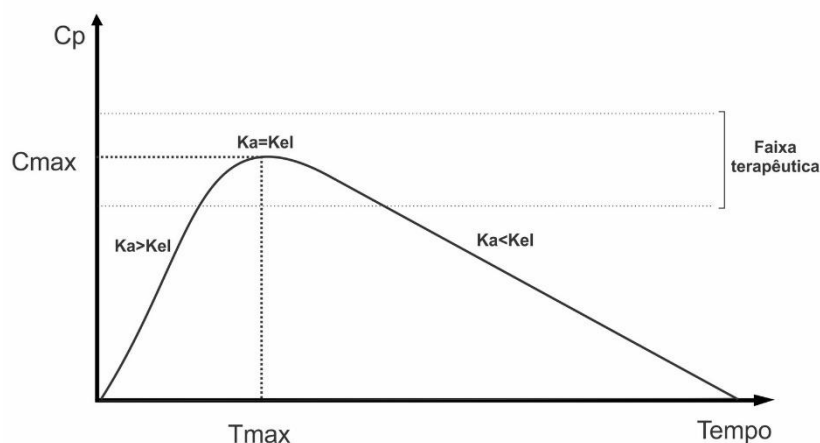
obter a meia vida de absorção ($t_{1/2a}$) que expressa o tempo necessário para que metade de uma determinada concentração seja absorvida.

Os resultados de K_a e meia-vida de absorção para o grupo ORAL-IFA e ORAL-DS foram: 0,0037 e 0,0083 min^{-1} ; 290,72 e 117,57 min, respectivamente. Esses resultados não apresentaram diferença estatística significativas tanto no K_a , quanto na $t_{1/2a}$, demonstrando que a formulação proposta não promoveu o aumento da velocidade de absorção para o grupo DS.

Outro parâmetro importante que deve ser avaliado é a concentração plasmática máxima (C_{max}). A C_{max} está diretamente ligada com a dose administrada e com a distribuição do fármaco no organismo, e sua ocorrência se deve ao equilíbrio entre a constante de absorção e a constante de eliminação do fármaco. O tempo para atingir a C_{max} (T_{max}) determina o intervalo exato que é necessário para que haja esse equilíbrio, dessa forma, podemos concluir que quando a velocidade de absorção se iguala à velocidade de eliminação, ambos os processos estão em equilíbrio, ou seja, a mesma quantidade da fração do fármaco absorvida é a mesma quantidade de fármaco que após a distribuição está sendo eliminado.

O T_{max} sofre influência da constante de absorção e da forma farmacêutica administrada, portanto, uma forma farmacêutica do tipo comprimido e/ou cápsulas terá este parâmetro maior em relação a uma forma farmacêutica do tipo solução e conseqüentemente a sua C_{max} será diferente.

Imagem 17: Influência da absorção e eliminação na C_{max} e T_{max} .



Fonte: Autoria própria.

A C_{max} do grupo ORAL-IFA e ORAL-DS foram de 1,46 e 1,66 µg/mL, respectivamente, e os tempos máximos para sua ocorrência na devida ordem, foram de 370 min e 240 min. Embora não observada diferença estatística em ambos os parâmetros, o coeficiente de variação do C_{max} nos mostra que o grupo IFA variou 62,69%, enquanto, que o grupo DS variou 48,20%, nos permitindo inferir que a formulação teste da indícios na diminuição da variabilidade intra grupo. Outro aspecto importante a ser observado é que C_{max} foi estatisticamente semelhante nos dois grupos porque a velocidade de absorção foi semelhante, assim como a extensão de absorção.

Os valores das concentrações plasmáticas de EFZ foram avaliados no estudo de Viljoen et al., (2010) ao longo de 6 meses em crianças africanas infectadas pelo HIV-1. As amostras de plasma contendo EFZ dentro da faixa terapêutica de 1-4 µg/mL representaram 58%, sendo 17% abaixo de 1 µg/mL e 25% acima de 4 µg/mL. Estudo semelhante realizado no Brasil por Cappellati e colaboradores (2014) mostrou que dos 41 pacientes infectados pelo HIV, 73% apresentaram níveis plasmáticos de EFZ dentro da faixa terapêutica, 17% mostraram-se com níveis abaixo e 10% com níveis acima da faixa terapêutica. Em ambos os estudos, os indivíduos que apresentaram concentrações plasmáticas acima da faixa terapêutica relataram efeitos adversos mais recentes ao longo do estudo, ao contrário dos demais indivíduos. Uma das razões possíveis para os níveis plasmáticos de EFZ fora do intervalo terapêutico aceito inclui a variação genética no metabolismo do fármaco e a variação da concentração plasmática máxima que cada indivíduo apresenta, evidenciando a alta variabilidade deste parâmetro.

Frente a esses resultados, a monitorização terapêutica do EFZ é bastante difundida, com interesse de minimizar a ampla variabilidade entre os pacientes que fazem o seu uso em virtude de ajustar as doses para que não ocorra a extrapolação da faixa terapêutica, levando o indivíduo a ter efeitos adversos e também para a concentração plasmática do EFZ não ficar abaixo da concentração plasmática alvo, o que leva a resistência do vírus da AIDS ao antirretroviral.

Melhorar a solubilidade com a técnica de dispersão amorfa-sólida é uma estratégia viável para o desenvolvimento de compostos praticamente insolúveis, fato esse comprovado pelo grande emprego dessa tecnologia em diversos estudos que visam melhorar a taxa de dissolução de fármacos refletindo de forma positiva na sua absorção.

Shah e colaboradores (2013) avaliaram a biodisponibilidade oral do vermurafenib em DS, fármaco classe IV segundo o SCB, empregado no tratamento de câncer de pele. No estudo foram utilizados 18 homens saudáveis com faixa etária entre 18 – 65 anos, dividido em dois grupos: os que receberam 160 mg de vermurafenib carregado em DS pelo polímero de succinato acetato de hipromelose (HPMCAS) e os que receberam 300 mg do fármaco em sua forma cristalina utilizado na terapêutica. Os resultados de ASC para a DS e forma cristalina foram de: $42,2 \mu\text{g/mL.h} \pm 25,52 \mu\text{g/mL.h}$ e $16,75 \mu\text{g/mL.h} \pm 11,66 \mu\text{g/mL.h}$, respectivamente, demonstrando que o fármaco em DS aumentou em aproximadamente 39% sua ASC em relação ao fármaco na forma cristalina. A obtenção desses dados possibilitou aos pesquisadores calcular a biodisponibilidade relativa da nova formulação, que mostrou ser 5x maior em relação a formulação não carregada. Outro fato importante do estudo em questão, é que, a utilização da DS possibilitou o emprego de menores dosagens do fármaco na formulação, visto que a dosagem maior administrada era para vencer o problema de absorção e permitir que as concentrações plasmáticas atingissem a faixa terapêutica.

Engers et al., (2010) avaliaram o perfil farmacocinético de uma administração de DS de itraconazol em cachorros. Antifúngico de amplo espectro classificado como fármaco classe II no SCB, o itraconazol apresenta alta variabilidade em suas concentrações plasmáticas em virtude do seu problema de solubilidade. A administração desse fármaco carregado por polímero ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC-P 55), em cachorros saudáveis pesando entre 14,4 e 16,3 kg, contribuiu para o aumento de 34,9% da C_{max} em relação a administração do itraconazol não carregado; outro resultado importante verificado foi a diminuição significativa da variabilidade das concentrações plasmáticas do itraconazol carregado pela DS, corroborando que a utilização dessa técnica é promissora para fármacos que apresentam problemas de solubilidade.

Também foram realizados estudos dessa técnica na área de fitoterápicos por pesquisadores da Coreia, cujo objetivo foi melhorar a solubilidade e absorção da curcumina. Presente no Açafrão da Índia, essa substância, é amplamente utilizada nos países Asiáticos como agente anti-inflamatório, porém, possui baixa solubilidade, que gera grande impacto na sua biodisponibilidade. Outro problema desse composto é a rápida degradação em contato com o pH estomacal, o que também contribui de forma significativa para a sua baixa absorção. Frente a esses

problemas, Seo e colaboradores (2012) carregaram a curcumina em DS com polímero Solutol® 1-10 e administraram na forma de suspensão em ratos machos pesando 240-280 g. Após análise dos parâmetros, a C_{max} da curcumina pura e carregada foi de: $15,62 \pm 12,6$ ng/mL e $95,60 \pm 53,8$ ng/mL, evidenciando que a DS promoveu a solubilização e absorção da curcumina, outro fator importante que os pesquisadores relataram, referiu-se ao aumento da estabilidade da curcumina, que sofreu degradação pelo suco gástrico de apenas 5%.

Portanto, a baixa variabilidade apresentada pela formulação de EFZ carregada com Dispersão Sólida reforça a possível aplicação futura em novos estudos pré-clínicos de farmacocinética em outros modelos animais, visto que a aplicação da técnica de carregamento possui resultados promissores nos estudos citados anteriormente e também neste estudo, para melhorar o perfil de absorção de fármacos que possuem absorção errática.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O grupo IV forneceu as informações necessárias a determinação da biodisponibilidade oral e as diferenças observadas entre o grupo IV e ORAL foi decorrente da interferência do processo de absorção sobre o parâmetro volume de distribuição, considerando a baixa solubilidade do ativo estudado.

A farmacocinética ORAL-IFA e DS não apresentaram diferenças estatísticas significativas, porém a variabilidade do EFZ carregado pela dispersão sólida foi menor, indicando vantagens na aplicação do sistema para a veiculação deste ativo para administração oral. E estes resultados apontam para a perspectiva de realização do estudo de farmacocinética em outras espécies, como macacos, cães, etc. para obter informações relevantes ao planejamento adequado do estudo clínico.

REFERÊNCIAS

De acordo com as normas da ABNT:

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ABIA, Associação Brasileira Interdisciplinar de AIDS. **Observatório Nacional de Políticas de AIDS**. Disponível em: <<http://abiaids.org.br/faq-hiv aids>>. Acesso em: 29 de agosto de 2017.

ADKINS, J.C.; NOBLE, S. Efavirenz. **Drugs**. v. 56, p. 1055-1064, 1988.

ALBERS, G. et al. Mechanism of drug release from polymethacrylate-based extrudates and milled strands prepared by hot-melt extrusion. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 387 – 394, 2009.

ALVES, L. D. S. **Desenvolvimento de dispersões sólidas binárias visando o incremento da solubilidade aquosa do antirretroviral efavirenz**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n.3, p. 413-420, 1995.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; DE OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2006.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. Cap. 12-13, p. 93-112,

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems**. 8th. ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

ARAÚJO L. U.; ALBUQUERQUE, K. T.; KATO, K. C.; SILVEIRA, G. S.; MACIEL, N. R.; SPÓSITO, P. A.; BARCELLOS, N. M. S.; SOUZA, J.; BUENO, M.; STORPIRTIS, S. Medicamentos genéricos no Brasil: panorama histórico e legislativo. **Rev Panam Salud Publica**, v. 28, n. 6, p. 480-492, 2010.

BALANI, S. K.; KAUFFMAN, L. R.; LUNA, F. A.; LIN, J. H. Nonlinear pharmacokinetics of efavirenz (DMP-266), a potent HIV-1 reverse transcriptase inhibitor, in rats and monkeys. **Drug Metabolism and Disposition**, v.27, n.1, p.41-45, 1998.

BANKER, G. C.; RHODES, C. T. **Modern Pharmaceutics**. 4th ed, New York: Informa Health Care, 2002.

BARRE-SINOUSI, F.; CHERMANN, J.; REY, F.; NUGEYRE, M.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DAUGUET, C.; AXLER-BLIN, C.; VEZINET-BRUN, F.; ROUZIQUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 200, p. 868 – 871, 1983.

BASTIAANS, D. ET.; CRESSEY, T. R. VROMANS, H.; BURGER, D. M. The role of formation on the pharmacokinetics of antiretroviral drugs. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**. v. 10, ed. 7, p. 1019-1037, 2014.

BAZIN, G. R.; GASPAR, M. C. S.; SILVA, N. C. X. N.; MENDES, C. C.; OLIVEIRA, C. P.; BASTOS, L. S.; CARDOSO, C. A. Terapia antiretroviral em crianças e adolescentes infectados pelo HIV: o que sabemos após 30 anos de epidemia. **Caderno de Saúde Pública**. v. 30, n°.4, Rio de Janeiro, 2014.

BENET, L. Z. The Role of BCS (Biopharmaceutics Classification System) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in Drug Development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 1, p. 34-42, 2013.

BENNETT, D. E.; BERTAGNOLIO, S.; SUTHERLAND, D.; GILKS, C. F. The World Health Organization's global strategy for prevention and assessment of HIV drug resistance. **Antiviral Therapy**. v. 2, p. 1 – 13, 2008.

BETHUNE, M. P. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: A review of the last 20 years (1989 – 2009). **Antiviral Research**, v.85, p.75-90, 2010.

BJORNSSON, T. D. Practical uses of individual pharmacokinetic parameters in drug development and clinical practice: examples and simulations. **European Journal Drug Metabolique Pharmacokinet**, v. 22, n. 1, p. 1-14, 1997.

BRASIL, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/aids>>. Acesso em 23 de outubro de 2015.

BRASIL, Ministério da saúde ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista de medicamentos de Referência**. ANVISA. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 26 outubro de 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 27, de 17 de maio de 2012. **Guia para validação de métodos bioanalíticos**. Diário Oficial da União, 10 de abril de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência. ANVISA. Disponível em: <http://www.anvisa.com.br>. Acesso em: 30 abril 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Recomendações para terapia antirretroviral em Adultos infectados pelo HIV: Manual de Bolso. Brasília, DF, p. 244, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Sintomas e fases da aids**. Brasília. 24 de abril de 2017. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/o-que-e-hiv/sintomas-e-fases-da-aids>> Acesso em 30 de agosto de 2017.

BRITO, A. M.; CASTILHO, E. A.; SZWARCOWALD, C. L. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.2, p. 207-217, 2000.

BROCKS, D. Pharmacokinetics in preclinical drug development: an overview. In CHAO et al., **Evaluation of drug candidates for preclinical development: pharmacokinetics, metabolism, pharmaceuticals, and toxicology**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010, p. 11-38.

BRODER, S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. **Antiviral Research**, v.85, n.1, p.1-18, 2010.

CAMPOS, D. R. **Avaliação in vitro – in vivo de duas formulações de pantoprazol: estudos farmacocinéticos e perfis de dissolução em meios biorelecentes**. Tese (Doutorado)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2008.

CAPPELLATI, T.; NORA, A. S.; FEISTAUER, M.; POETA, J. Avaliação dos níveis plasmáticos de efavirenz e sua relação com efeitos colaterais de pacientes do ambulatório de HIV/AIDS do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **II Congresso de Pesquisa e Extensão da FSG**. v. 2, n. 2, p. 773 – 776, 2014.

CAWELLO, Willi (Ed.). **Parameters for Compartment Free Pharmacokinetics: Standardisation of Study Design, Data Analysis and Reporting**. Aachen, Germany: Shaker Verlag GmbH, 2003.

CDC - Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men- New York City and California. **MMWR Morb Mortal Wkly**. v. 30, p. 305-308, 1981.

CHIAPPETTA, D.A.; HOCHT, C.; TAIRA, C.; SOSNIK, A. Oral pharmacokinetics of the anti-HIV efavirenz encapsulated within polymeric micelles. **Biomaterials**, v. 32, n.9, p.2379-2387, 2011.

CHOW, S. C.; LIU, J. P. **Design and Analysis of Bioavailability and bioequivalence Studies**. New York: Marcel Dekker. 2000.

CHOWDARY, K. P. R.; ENTURI, V. Preclinical Pharmacokinetic Evaluation of Efavirenz Solid Dispersions in Two New Modified Starches. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 89 – 92, 2013.

CLAVEL, F.D.; GUETARD, D.; BRUN-VIZINET, F.; CHAMARET, S.; REY, M. A.; SANTOS-FERREIRA, M. O.; LAURENT, A. G.; DAUGUET, C.; KATLAMA, C.; ROUZIOUS, C. Isolation of a new retrovirus from West Africa patients with AIDS. **Science**, 233: 343-346, 1986.

COFFIN, J.; HAASE, A.; LEVY, J. A.; MONTAGNIER, L.; OROSZLAN, S.; TEICH, N. What to call the AIDS vírus? **Nature**. v.321, n. 6065, p.10, 1986.

COSTA, S. P. M. **Avaliação do método de dispersão sólida para o aumento da velocidade de dissolução do efavirenz na terapia ANTI-HIV**. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

COSTA, S. P. M. Obtenção de sistemas poliméricos microparticulados para o aumento da velocidade de dissolução do efavirenz na terapia anti-HIV. Repositório Institucional da UFPE. 2016.

COTRAN, R.; HUMAN, V.; COLLINS, T. **Robbins** – Patologia Estrutural e Funcional. In: Doenças da Imunidade. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p. 211-224.

CSAJKA, C.; MARZOLINI, C.; FATTINGER, K.; DE´COSTERD, L.A.; FELLAY, J.; TELENTI, A.; BIOLLAZ, J.; BUCLIN, T. Population pharmacokinetics and effects of efavirenz in patients with human immunodeficiency virus infection. **Clinical pharmacology & therapeutics**, v. 73, n.1, p.20-30, 2003.

CUNHA, L. F. Fisiologia digestiva do coelho – Aspectos mais relevantes. **Proceedings de Jornadas Internacionais de Cunicultura**. p. 49-69, 2000.

CUNICO, W.; GOMES, C. R. B.; VELLASCO JUNIOR, W. T. HIV- Highlights in Drug Research. **Quimica Nova**. v.31. p. 2111-2117, 2008.

DAVANÇO, M. G. **Farmacocinética do benznidazol administrado em colehos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação prolongada**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, 2015.

DAVIDSON, F.; YIRRELL, D. L.; LYCETT, C.; PETRIK, J.; DOW, B. C. Human immunodeficiency virus 1 subtypes detected in Scottish blood donors. **Vox Sanguinis**, v. 96, p.160-162, 2009.

DAY, M. Patient Adherence to HAART Regimens: Challenges for Physician Assistants and Health Care Providers. **The Internet Journal of Academic Physician Assistants**, v. 3, n.1, 2003.

DE CLERCQ, E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.33, n.4, p. 307 – 320, 2009.

DIEHL, K. H.; HULL, R.; MORTON, D.; PFISTER, R.; RABENMAMPIANINA, Y.; SMITH, D.; VIDAL, J. M.; VORSTENBOSCH, C. V. D. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 15 - 23, 2001.

DRUGBANK. Physical and chemical characteristics of Efavirenz. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00625>> Acesso em: 07 de setembro de 2017.

ENGERS, D.; TENG, J.; JIMENEZ-NOVOA, J.; GENT, P.; HOSSACK, S.; CAMPBELL, C.; THOMSON, J.; IVANISEVIC, I.; TEMPLETON, A.; BYRN, S.; NEWMAN, A. A solid-state approach to enable early development compounds: Selection and animal bioavailability studies of an itraconazole amorphous solid dispersion. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 99, p.3901-3922, 2010.

FABBIANI, M.; GIAMBENEDETTO, S.; BRACCIALE, L.; BACARELLI, A.; RAGAZZONI, E.; CAUDAR, R.; NAVARRA, P.; DE LUCA, A. Pharmacokinetic variability of antiretroviral drugs and correlation with virological outcome: 2 years of experience in routine clinical practice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p.109 – 117, 2009.

FERREIRA, W. M.; SAAD, F. M. O. B.; PEREIRA, R. A. N. Fundamentos da nutrição de coelhos. **Repositório da Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Zootecnia**. 2011. p.1-92.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Guidance for industry: Waiver of in vivo bio-availability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system, Rockville, 2000 <<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf>> Acesso em: 2 de setembro de 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Highlights of Prescribing Information – Sustiva (Efavirenz) capsules and tablets. Rockville. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/020972s035,021360s023lbl.pdf> Acesso em: 9 de setembro de 2017.

FREED, E. O. HIV-1 replication. **Somatic Cell and Molecular Genetics**. v.26, n. 1-6, p. 13-33, 2002.

FRIEDLAND, G.; KHOO, S.; JACK, C.; LALLO, U. Administration of efavirenz (600mg/day) with rifampicin results in highly variable levels but excellent clinical outcomes in patients treated for tuberculosis and HIV. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p. 1299 – 1302, 2006.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica. Fundamentos da Terapêutica Racional**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

GALLO, R.C.; SARIN, P. S.; GELMANN, E. P.; ROBERT-GUROFF, M.; RICHARDSON, E.; KALYA-NARAMAN, V. S.; MANN, D.; SIDHU, G. D.; STAHL, R. E.; ZOLLA-PAZNER, S.; LEI-BOWITCH, J.; POPOVIC, M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v.220, p.865 – 867, 1983.

GAO, J.Z.; HUSSAIN, M.A.; MOTHERAM, R.; GRAY, D.A.B.; BENEDEK, I.H.; FISKE, W.D.; DOLL, W.J.; SANDEFER, E.; PAGE, R.C.; DIGENIS, G.A.

Investigation of Human Pharmacoscintigraphic Behavior of Two Tablets and a Capsule Formulation of a High Dose, Poorly Water Soluble/Highly Permeable Drug (Efavirenz). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.96, n.11, p.2970-2977, 2007.

GARBIN, C. A. S.; GATTO, R. C. J.; GARBIN, A. J. Í. Adesão à terapia antirretroviral em pacientes HIV soropositivos no Brasil: uma revisão da literatura. **Archives of Health Investigation**. v.6, p.65-70, 2017.

GIBALDI, M. **Bipharmaeueuties and Clinical Pharmacokinetics**. 4th. ed. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1991.

GIDENNE T.; LEBAS F. Evolution circadienne du contenu digestif chez le lapin en croissance. **Relation avec la caecotrophie. Proc 3 rd Congr. Of the World Rabbit**, v. 2, p. 494-501, 1984.

GOTTLIEB M.S., MILDVAN D., PINCHING, A.J., QUINN T.C. **Current topics in AIDS**. New York: JOHN WILEY & SONS, 1989.

GOTTLIEB, M. S.; SCHANKER, H. M.; FAN, P. T.; SAXON, A.; WEISMAN, J. D.; POZALSKI, I. Pneumocystis pneumonia – Los Angeles. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 30, n. 21, p. 250-252, 1981.

GRAHAM, R.; HARRIS, R.; LAU, D. Pharmacokinetics and its role in small molecule drug discovery. **Research Medical Review**, v.21, n.5, p.382-396, 2001.

GROTTO R. M. T.; PARDINI M. I. M. C. Molecular biology of the HIV-1 and genetics of human resistance to AIDS. **Arquivos Ciência e Saúde**. v. 13, n.3, p.162-165, 2006.

HEENEY J. L., Dalgleish A. G., Weiss R. A. Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. **Science**. v. 313, p. 462-466, 2006.

HUGHES, J. P.; REES, S.; KALINDJIAN, S. B.; PHILPOTT, K. L. Principles of Early Drug Discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239-1249, 2011.

HUISINGA, W.; TELGMANN, R.; WULKOW, M. The virtual laboratory approach to pharmacokinetics: design principles and concepts. **Drug Discovery Today**. v. 11, p. 800 - 805, 2006.

HYMES K. B., CHEUNG T., GREENE J. B., PROSE N. S., MARCUS A., BALLARD H., WILLIAM D. C., LAUBENSTEIN L. J. Kaposi's sarcoma in homosexual men—a report of eight cases. **Lancet**. v. 2, p. 598-600, 1981.

JORNAL O DIA. Número de infectados pela Aids volta a subir no Brasil alerta pesquisa. **Jornal o Dia**. Publicado em: 12 de julho de 2016. Disponível em: <<http://odia.ig.com.br/brasil/2016-07-12/numero-de-infectados-pela-aids-volta-a-subir-no-brasil-alerta-pesquisa.html>> Acesso: 30 de agosto de 2017.

KARARLI, T. T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 16, p. 351-380, 1995.

KASSY, G. S.; NASCIMENTO, L. V.; UBIRAJARA, I. T.; ANDRADE, C.; FROES, T. R.; SOTOMAIOR, C. S. Características ultrassonográficas de fígado, vesícula biliar, rins, vesícula urinária e jejuno em coelhos jovens e adultos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 415-423, 2017.

KAUL, S.; JI, P.; LU, M.; NGUYEN, K.L.; SHANGGUAN, T.; GRASELA, D. Bioavailability in healthy adults of efavirenz capsule contents mixed with a small amount of food. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v.67, n.3, p.217-222, 2010.

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. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, p. 1 – 10, 2011.

KHANNA, I. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 19-20, p. 1088-1102, 2012.

KILMARX P.H. Global epidemiology of HIV. **Current Opinion HIV AIDS**. v. 4. p. 240-246, 2009.

KLIMAS, N.; KONERU, A. O.; FLETCHER, M. A. Overview of HIV. **Psychosomatic Medicine**. v. 70. p. 523-530, 2008.

KWON, Y. **Handbook of Essential Pharmacokinetics, pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists**. 1^a ed. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002. 287p.

LEBAS, F. La nutrition du lapin: mouvement des digest et transit. **Cuniculture** v.6, p. 67-68,1979.

LIN, J. H.; LU, A. Y. H. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 49, n. 4, p. 403-449, 1997.

LOPES, D. C.; SOUZA, A. V. C. Estudo comparativo sobre a evolução das pesquisas em coelhos, aves e suínos. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA E TECNOLOGIA EM CUNICULTURA, 3., 1999, Jaboticabal, SP: FCAV, 1999.

MADHAVI, B. B.; KUSUM, B.; CHATANYA, C. H. K.; MADHU, M. N.; HARSHA, V. S.; BANJI, D. Dissolution enhancement of efavirenz by solid dispersion and PEGylation techniques. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 1, n. 1, p. 29-34, 2011.

MAGGIOLO, F. Efavirenz: a decade of clinical experience in the treatment of HIV, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 910-928, 2009.

MANAVI, K. A review on infection with human immunodeficiency virus. **Best practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 20, p. 923-940, 2006.

MANN J. M. **AIDS: A worldwide pandemic**. London: John Wiley & Sons, 1989.

MARCELIN, A. G.; CECCHERINI-SILBERSTEIN, F.; PERNO, C. F.; CALCEZ, V. Resistance to novel drug classes. **Current Opinion in HIV and AIDS**. v.4, p.531 – 537, 2009.

MARZOLINI, C.; TELENTI, A.; BUCLIN, T.; BIOLLAZ, J.; DECOSTERD, L.A. Simultaneous determinations of the HIV protease inhibitors indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir and the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v.740, p.43-58, 2001.

MEDEIROS, G. C. R. **Determinação espectrofotométrica do pKa e desenvolvimento de dispersões sólidas da nova entidade química LPSF/FZ4: um promissor agente esquistossomicida**. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MELO, E. B.; BRUNI, A. T.; FERREIRA, M. M. C. Inibidores da HIV-integrase: Potencial abordagem farmacológica para tratamento da AIDS. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 555 – 562, 2006.

MENENDEZ, Raul Castillo. Animales de Laboratorio en las investigaciones Biomédicas. La Habana: Editorial Ciências Medicas, 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. Brasília: Ministério da Saúde. 2015.

MORENO, J.; DOMÉNECH, J. Administración extravasal. Modelo bicompartimental. In: DOMÉNECH BERROZPE, J. D.; MARTÍNEZ LANA O, J. M. PLÁ DELFINA, J. M. **Biofarmacia y Farmacocinética**. Volumen I: Farmacocinética. Madrid: Editorial Síntesis, 2001. p. 167-200.

MOULY, S.; LOWN, K. S.; KORNHAUSER, D.; JOSEPH, J. L.; FISKE, W. D.; BENEDEK, I. H.; WATKINS, P. B. Hepatic but not intestinal CYP3A4 displays dose-dependent induction by efavirenz in humans. **Pharmacokinetics and drug disposition**, v.72, n.1, p.1-9, 2002.

MOURA, A. S. A. M. T. Fisiologia da Reprodução e Manejo Reprodutivo de Coelhas. **Repositório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu**, Botucatu, 2013. p. 1-18.

MUKONZO, J. K.; NANZIGU, S.; REKIC, D.; WAAKO, P.; ROSHAMMAR, D.; ASHTON, M.; OGWAL-OKENG, J.; GUSTAFSSON, L. L.; AKLILLU, E. HIV/AIDS Patients display lower relative bioavailability of efavirenz than healthy subjects. **Clinical Pharmacokinetics**. v.50, n.8, p.531-540, 2011.

NAZARI, R.; JOSHI, S. CCR5 as target for HIV-1 gene therapy. **Current Gene Therapy**. v.8, n;4, p. 264-72, 2008.

NEERVANAN, S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 2, n. 5, p. 715-731, 2006.

OFFICE OF AIDS RESEARCH ADVISORY COUNCIL (OARAC). Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guideline for the use of antiretroviral agents in HIV-1 infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services, 2011. p. 1-167.

OFOTOKUN, I.; CHUCK, S. K.; HITTI, J. E. Antiretroviral Pharmacokinetic Profile: A Review of Sex Differences. **Gender Medicine**, v.4, n.2, p. 106 – 119, 2007.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2.^a ed., São Paulo: Atheneu, 2003.

PASANEN, M. Species differences in CYP enzymes. **Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia**, Madrid: Real Academia de Farmácia, 2004.

PAUDEL, A.; WORKU, Z. A.; MEEUS, J.; GUNS, S.; MOOTER, G. V. Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, p. 253 – 284, 2012.

PEÇANHA, E.P.; ANTUNES, O.A.C.; TANURI, A. Estratégia farmacológicas para a terapia anti-AIDS. **Química Nova**, v.25, n.6B, p. 1108-1116, 2002.

PETROVA, E. Innovation in the Pharmaceutical Industry: The Process of Drug Discovery and Development. In DING, M. et al. (eds.), **Innovation and Marketing in the Pharmaceutical Industry, International Series in Quantitative Marketing**. New York: Springer, 2014. p. 19-81.

PIERI, F. M.; LAURENTI, R. HIV/AIDS: Perfil epidemiológico de adultos internados em hospital universitário. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 11, p. 144 – 152, 2012.

PINTO, C. E. C. Dados biológicos das espécies mais utilizadas em laboratório. **Repositório da Universidade Federal Fluminense – Dept. Imunobiologia**, 2009. Disponível em: <http://www.uff.br/animaislab/>, acesso em 15 de janeiro de 2018.

PINTO, M. E.; STRUCHINER, C. J. A diversidade do HIV-1: uma ferramenta para o estudo da pandemia. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, p. 473-484, 2006.

PLANTIER, J. C.; LEOZ, M.; DICKERSON, J. E.; DE OLIVEIRA, F.; CORDONNIER, F.; LEMEE, V.; DAMOND, F.; ROBERTSOON, D. L.; SIMON, F. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nature Medicine**, v. 15, p. 871-872, 2009.

RAMBAUT, A. POSADA, D. CRANDALL, K. A. HOLMES, E.C. The causes and consequences of HIV evolution. **Nature Reviews. Genetics**; London. v.5, p. 52-61, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Absorção, distribuição e destino de fármacos. In RANG et al., **Farmacologia**. 3ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 51-75.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P. **Farmacologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 684 – 690.

REN, J.; NICHOLS C. E.; STAMP, A.; PHILIPS, P.; CHAMBERLAIN, P. P; ROBERT FERRIS, R.; KURT, L.; WEAVER, K. L.; SHORT, S. A.; STAMMERS, D. K.; Structural insights into mechanisms of non-nucleoside drug resistance for HIV-1 reverse transcriptase mutated at codons 101 or 138. **FEBS Journal**. v. 273, p. 3850-3860, 2006.

RIBERA, E. TUSET, M.; MARTÍN, M.; CACHO, E. D. Características de los fármacos antirretrovirales. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, n. 5, p. 362 – 391, 2011.

RUDNIC, E. M.; SCHWARTZ, J. D. Oral solid dosage forms. In: Remington: **The Science and Practice of Pharmacy**. 20th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.858-893.

RUIZ-GARCIA, A.; BERMEJO, M.; MOSS, A.; CASABO. Pharmacokinetics in drug Discovery. **Journal of Pharmaceuticals Sciences**. v. 97, p. 654-690, 2008.

SATHIGARI S, CHADHA G, LEE YHP, WRIGHT N, PARSONS DL, RANGARI VK, FASINA O, BABU RJ. Physicochemical Characterization of Efavirenz–Cyclodextrin Inclusion Complexes. **AAPS Pharm Sci Tech**. v. 10, p. 81-87, 2009.

SEO, S. W.; HAN, H. K.; CHUN, M. K.; CHOI, H. K. Preparation and pharmacokinetic evaluation of curcumin solid dispersion using Solutol® HS15 as a carrier. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 424, p.18-25, 2012.

SEPKOWITZ, K. A. AIDS – the first 20 years. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 344, n. 23,p. 1764-1772, jun. 2001.

SHAH, N.; IYER, M. I.; MAIR, H. J.; CHOI, D. S.; TIAN, H.; DIODONE, R.; FAHNRICH, K.; PABST-RAVOT, A.; TANG, K.; SCHEUBEL, E.; IBRAHIM, P. H.; SANDHU, H.; RUBIA, L.; CHOKSHI, H.; SINGHAL, D.; MALICK, W. Improved human bioavailability of vemurafenib, a practically insoluble drug, using an amorphous polymer-stabilized solid dispersion prepared by a solvent-controlled coprecipitation process. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 102, p.967-981, 2013.

SHANKAR, K. R.; CHOWDARY, K. P. R. A factorial study on enhancement of solubility and dissolution rate of efavirenz employing β -cyclodextrin, soluplus and PVPK30. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 3, p. 578 – 586, 2013.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 5th. ed., New Baskerville: McGraw Hill, 2005.

SHARMA, A.; JAIN, C. P. Solid dispersion: A promising technique to enhance solubility of poorly water soluble drug. **International Journal of Drug Delivery**, v. 3, p. 149-170, 2011.

SHOENWALD, G. **Pharmacokinetics in Drug Discovery and Development**. Florida: CRC Press, 2002.

SINGH, B. et al. Formulation development of gastroretentive tablets of lamivudine using the floating-bioadhesive potential of optimized polymer blends. **Journal Pharma- Pharmacol**, v. 64, n. 5, p. 654-669, 2012.

SMITH, S. D., & D. S. GREGORY. A circadian rhythm of aqueous flow underlies the circadian rhythm of IOP in NZW rabbits. **Investigative ophthalmology & visual science** ed. 4, vol. 30. p. 775-778, 1989.

SOMOZA, M. C. Administración intravenosa rápida: datos plasmáticos. In: ROS et al. **Biofarmacia y Farmacocinética. Ejercicios y problemas resueltos**. Barcelona: Elsevier, 2008. cap. 6, p. 77-86.

SOUZA, N.L; MERUSSE, L.B. A utilização de animais de Laboratório In: DE LUCA, R. R. et al. (Orgs.). **Manual para Técnicos em Bioterismo**. 2. ed. São Paulo: Winner Graph, 1996. Cap. 1, p.3-10.

SRINARONG, P. et al. Surface-Active Derivate of Inulin (Inutec R SP1) Is a Superior Carrier for Solid Dispersions with a High Drug Load. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.100, n. 6, p. 2333-2342, 2011.

STEINBROOK, R. Scientific Mystery, a massive cover-up, and the dark legacy of Robert Gallo. **The New England Journal Medicine**, v. 347, p. 771-772, 2002.

STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J. E. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

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. **Molecular Pharmaceutics**, v. 3, n. 6, p. 631 – 643, 2006.

TESTA, E.C.; GUARALDO, L.; TEIXEIRA, J.L. & SILVA, G.M.S. Estudo das Reações Adversas ao Efavirenz em pacientes tratados no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. 5º Congresso RIOPHARMA de Ciências Farmacêuticas e CRF-RJ, 2007.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Plasma clearance. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 27, p. 415-425, 2004b.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Volumes osdistribution. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 27, p. 441-453, 2004a.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, S. Plasma terminal half-life. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 27, p. 427-439, 2004c.

TOZER, T. N. Concepts basic to pharmacokinetics. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 12, n. 1, p. 109-131, 1981.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. **Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica: As Bases Quantitativas da Terapia Farmacológica**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2009. cap. 5, p. 75-116.

TOZZI, V. Pharmacogenetics of antiretrovirals. **Antiviral Research**, v.85, n.1, p.190-200, 2010.

TSUCHIYA, K.; GATANAGA, H.; TACHIKAWA, N.; TERUYA, K.; KIKUCHI, Y.; YOSHINO, M.; KUWAHARA, T.; SHIRASAKA, T.; KIMURA, S.; OKAA, S. Homozygous CYP2B6 *6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 319, n.4, p. 1322-1326, 2004.

TURNER, B. G.; SUMMERS, M. F. Structural biology of HIV. **Journal of Molecular Biology**, v. 285, p. 1-32, 1999.

UNAIDS, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. UNAIDS. Disponível em: <<http://unaid.org.br/>> Acesso: 20 de outubro 2016.

UNAIDS, Relatório epidemiológico BRASIL. UNAIDS. Disponível em: <http://unaid.org.br/wpcontent/uploads/2017/07/20170720_Data_book_2017_Brasil.pdf> Acesso em: 30 de agosto de 2017.

VAN DE GRAAFF, K. M. **Anatomia humana**. 6.^a ed., São Paulo: Manole, 2003.

VIANA, O. S.; JÚNIOR, J. B.; SILVA, R. M. F.; MEDEIROS, F. P. M.; JÚNIOR, S. G.; ALBUQUERQUE, M. M.; NETO, P. J. R. Desenvolvimento de formulações e tecnologia de obtenção de comprimidos revestidos de efavirenz – terapia anti-HIV. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.42, n. 4, 2006.

VIDYADHARA, R.; SASIDHAR, R. L. C.; NAGARAJU, R. Design and development of polyethylene oxide based matrix tablets for verapamil hydrochloride. **Indian Journal PharmSci**, v. 75, n.2, p. 185-190, 2013.

VIEIRA, C. M. **Farmacocinética pré-clínica e avaliação toxicológica preliminar da nova tiazolidinadiona desenvolvida para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2: 5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (GQ-2)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Araraquara, 2013.

VILJOEN, M.; GOUS, H.; KRUGER, H, S.; RIDDIK, A.; MEYERS. T, M.; RHEEDERS, M. Efavirenz plasma concentrations at 1, 3, and 6 months post-antiretroviral therapy initiation in HIV type 1- Infected south african children. **Research and Human Retroviruses**. v. 6, ed. 6, p. 613-619, 2010.

VOGT, M.; KUNATH, K.; DRESSMAN, J. B. Dissolution enhancement of fenofibrate by micronization, con grinding and spray-drying: Comparison with commercial preparations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 2, p. 283 – 288, 2008.

WIGG, M. D.; SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V. **Introdução à Virologia Humana**. Vírus da Imunodeficiência Humana. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2002.

WIGG, M.D., SANTOS, N. S. O., ROMANOS, M. T. V. **Introdução à Virologia Humana**. In: Vírus da Imunodeficiência Humana. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2002. p.183-197.

WINTER, M. E. **Farmacocinética Clínica Básica**. 1^a ed. São Paulo: Pharmabooks. p. 10-50, 2012.

WOODMAN, Z.; WILLIAMSON, C.; HIV molecular epidemiology: transmission and adaptation to human populations. **Current Opinion in HIV AIDS**. v. 4, p. 247-252, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents**. Department of Health and Human Services (DHHS), 2009.

YANG, J.; GREY, K.; DONEY, J. An improved kinetics approach to describe the physical stability of amorphous solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 284, n.1-2, p. 24-31, 2010.

ZDANOWICZ, M. M. The Pharmacology of HIV Drug Resistance. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v.70, p.1-9, 2006.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Resultados individuais do grupo EFZ-IV

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Média		
Dose IV: 2,7mg/kg										
Peso (kg)	2,79	2,74	2,69	2,55	2,91	2,75	3,21	2,80		
PARÂMETROS									Desvio Padrão	CV (%)
kel (min ⁻¹)	0,0226	0,0114	0,0062	0,0183	0,0106	0,0116	0,0116	0,0132	0,0055	41,3643
t 1/2 (min)	30,6637	60,7895	111,7742	37,8689	65,3774	59,7414	59,7414	60,8509	25,9986	42,7252
ASC 0-t (µg/mL.min)	95,6389	103,5873	236,3856	82,3960	118,9725	105,8987	103,3552	120,8906	52,1119	43,1067
ASC 0-inf (µg/mL.min)	103,0544	115,2808	268,6922	87,0819	131,4175	117,5104	111,0906	133,4468	61,1727	45,8405
r areas	0,9280	0,8986	0,8798	0,9462	0,9053	0,9012	0,9304	0,9128	0,0229	2,5067
Cl (mL/min/kg)	26,1998	23,4211	10,0487	31,0053	20,5452	22,9767	24,3045	22,6430	6,4430	28,4547
Vd área (mL/kg)	1159,2817	2054,4796	1620,7539	1694,2793	1938,2276	1980,7488	2095,2146	1791,8551	330,9205	18,4680
Vc (mL/kg)	1179,2968	2102,6400	1630,2379	1754,2720	1947,2090	2052,2955	2122,3078	1826,8941	339,5871	18,5882
MRT (min)	44,2478	87,7193	161,2903	54,6448	94,3396	86,2069	86,2069	87,8079	37,5161	42,7252
ASMC 0-t (µg/mL.min)	3140,3845	6561,2285	27257,3595	3520,8771	8310,6932	6431,2476	6896,5903	8874,0544	8316,8663	93,7212
ASMC 0-inf (µg/mL.min)	4358,3580	10393,4253	44098,4505	4620,3887	12471,5450	10219,0643	9419,9224	13654,4506	13763,6926	100,8000

K_{el}: constante de eliminação; T_{1/2}: meia vida de eliminação; ASC_{0-t}: área sob a curva até o último tempo quantificável; ASC_{0-∞}: área sob a curva de zero extrapolado ao infinito; R_{áreas}: relação entre as áreas; Cl: *clearance*; Vd: volume de distribuição; Vc: volume de distribuição central; MRT: tempo de residência médio; ASMC_{0-t}: área sob o momento da curva de zero ao último tempo quantificável; ASMC_{0-∞}: área sob o momento da curva de zero extrapolado ao infinito.

Apêndice 2 – Resultados individuais do grupo EFZ-IFA

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Média		
Dose ORAL ug/Kg	14534,88372	16025,64103	16949,15254	15673,98119	16286,64495	16835,01684			
Peso (kg)	3,44	3,12	2,95	3,19	3,07	2,97	3,12		
PARÂMETROS								Desvio Padrão	CV (%)
kel (min-1)	0,0022	0,0043	0,0005	0,0030	0,0026	0,0005	0,0022	0,0015	67,8986
t 1/2 (min)	315,0000	161,1628	1386,0000	231,0000	266,5385	1386,0000	624,2835	592,1511	94,8529
ASC 0-t (µg/mL.min)	280,7952	425,1819	432,6150	1479,4073	1173,7972	953,1150	790,8186	483,5889	61,1504
ASC 0-inf (µg/mL.min)	305,6257	433,3596	910,6150	1594,0265	1359,7292	2035,1699	1106,4210	677,8087	61,2614
r areas	0,9188	0,9811	0,4751	0,9281	0,8633	0,4683	0,7724	0,2359	30,5452
Cl (mL/min/kg)	63,7274	49,5532	24,9412	13,1762	16,0503	11,0845	29,7555	21,8199	73,3305
Vd (mL/kg)	28967,0161	11524,0014	49882,4737	4392,0505	6173,2043	22169,0804	20517,9711	17222,6344	83,9393
Vc (mL/kg)	12385,4307	6741,2836	50590,4601	2485,7959	3024,4890	23532,6909	16460,0250	18448,6214	112,0814
MTT (min)	454,5455	232,5581	2000,0000	333,3333	384,6154	2000,0000	900,8421	854,4749	94,8529
ASMC 0-t (µg/mL.min)	201033,2240	129831,8175	296532,6000	645192,9234	612562,5791	664527,3169	424946,7435	242828,0086	57,1432
ASMC 0-inf (µg/mL.min)	248075,7627	140565,5415	1940852,6000	807188,1140	884881,4496	4386796,1417	1401393,2683	1596454,7433	113,9191
F	0,4160	0,5350	1,0629	2,0120	1,6517	2,3917	1,3449	0,8041	59,7926
Ka (min-1)	0,0027	0,0085	0,0049	0,0027	0,0022	0,0010	0,0037	0,0027	73,1940
t 1/2 absorção (min)	256,6667	81,5294	141,4286	256,6667	315,0000	693,0000	290,7152	214,8426	73,9014
MAT (min)	370,3704	117,6471	204,0816	370,3704	454,5455	1000,0000	419,5025	310,0181	73,9014
Tmax (min)	480,0000	180,0000	360,0000	360,0000	480,0000	360,0000	370,0000	110,0909	29,7543
Cmax (µg/mL)	0,6123	1,7175	0,4880	2,7640	2,1789	0,9840	1,4574	0,9136	62,6856
MRT (min)	441,3275	206,7153	1927,2830	136,0127	196,2322	1155,4938	677,1774	720,0941	106,3376
t lag (min)	0,6357	0,3354	2,2177	0,1183	0,1386	1,0306	0,7461	0,7988	107,0734

Kei: constante de eliminação; T_{1/2}: meia vida de eliminação; ASC_{0-t}: área sob a curva até o último tempo quantificável; ASC_{0-∞}: área sob a curva de zero extrapolado ao infinito; R_{áreas}: relação entre as áreas; Cl: *clearance*; Vd área: volume de distribuição; Vc: volume de distribuição central; MRT: tempo de residência médio; ASMC_{0-t}: área sob o momento da curva de zero ao último tempo quantificável; ASMC_{0-∞}: área sob o momento da curva de zero extrapolado ao infinito; F_{oral}: biodisponibilidade oral; Ka: constante de absorção; T_{1/2a}: meia vida de absorção; MAT: tempo médio de absorção; T_{máx}: tempo para atingir a C_{máx}; C_{máx}: concentração plasmática máxima; MTT: tempo de trânsito médio; Tlag: tempo para o início da absorção.

Apêndice 3 – Resultados individuais do grupo EFZ-DS

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Média		
Dose ORAL ug/Kg	15812,77672	18341,89288	20161,29032	20242,91498	15576,32399	17182,13058	13888,88889			
Peso (kg)	3,162	2,726	2,48	2,47	3,21	2,91	3,6	2,94		
PARÂMETROS									Desvio Padrão	CV (%)
kel (min-1)	0,0034	0,0010	0,0016	0,0024	0,0043	0,0034	0,0011	0,0025	0,0013	52,2167
t 1/2 (min)	203,8235	693,0000	433,1250	288,7500	161,1628	203,8235	630,0000	373,3835	216,5169	57,9878
ASC 0-t (µg/mL.min)	780,3902	600,5283	1839,8682	1116,1613	601,2458	867,9066	450,0974	893,7425	470,1933	52,6095
ASC 0-inf (µg/mL.min)	815,4685	931,7465	2210,0890	1163,0209	608,8116	878,1538	579,3522	1026,6632	558,1882	54,3692
r areas	0,9570	0,6445	0,8325	0,9597	0,9876	0,9883	0,7769	0,8781	0,1316	14,9866
Cl (mL/min/kg)	21,9119	22,2446	10,3083	19,6682	28,9108	22,1098	27,0896	21,7490	5,9922	27,5514
Vd área (mL/kg)	6444,6666	22244,6109	6442,6869	8195,0712	6723,4474	6502,8830	24626,9464	11597,1875	8139,8123	70,1878
Vc (mL/kg)	3669,6706	19278,5883	3613,8798	6620,0805	3906,9269	4701,9010	20991,1183	8968,8808	7712,8603	85,9958
MTT (min)	424,6248	1062,3237	950,4364	479,6939	353,0633	383,6770	992,8378	663,8081	320,2534	48,2449
ASMC 0-t (µg/mL.min)	298066,3422	300882,4618	1336043,1277	470891,2365	205018,4882	319157,5342	271571,4120	457375,8004	395689,3522	86,5130
ASMC 0-inf (µg/mL.min)	346268,1525	989816,4425	2100548,9340	557893,9774	214949,0784	336927,4499	575202,8288	731658,1234	654026,7551	89,3897
F	1,0203	1,0050	2,1687	1,1366	0,7733	1,0111	0,8253	1,1343	0,4727	41,6740
Ka (min-1)	0,0079	0,0038	0,0024	0,0130	0,0075	0,0117	0,0117	0,0083	0,0041	49,5339
t 1/2 absorção (min)	87,7215	182,3684	288,7500	53,3077	92,4000	59,2308	59,2308	117,5727	87,5238	74,4422
MAT (min)	126,5823	263,1579	416,6667	76,9231	133,3333	85,4701	85,4701	169,6576	126,2969	74,4422
Tmax (min)	240,0000	180,0000	480,0000	180,0000	120,0000	120,0000	360,0000	240,0000	134,1641	55,9017
Cmax (µg/mL)	1,2835	0,9946	2,5393	2,7334	1,5718	1,9178	0,5478	1,6554	0,7980	48,2056
MRT (min)	298,0425	799,1658	1367,1030	402,7708	219,7300	298,2069	907,3677	613,1981	425,6626	69,4168

K_{el}: constante de eliminação; T_{1/2}: meia vida de eliminação; ASC_{0-t}: área sob a curva até o último tempo quantificável; ASC_{0-∞}: área sob a curva de zero extrapolado ao infinito; R_{áreas}: relação entre as áreas; Cl: *clearance*; Vd área: volume de distribuição; Vc: volume de distribuição central; MRT: tempo de residência médio; ASMC_{0-t}: área sob o momento da curva de zero ao último tempo quantificável; ASMC_{0-∞}: área sob o momento da curva de zero extrapolado ao infinito; F_{oral}: biodisponibilidade oral; Ka: constante de absorção; T_{1/2a}: meia vida de absorção; MAT: tempo médio de absorção; T_{máx}: tempo para atingir a C_{máx}; C_{máx}: concentração plasmática máxima; MTT: tempo de trânsito médio; Tlag: tempo para o início da absorção.

ANEXO**Anexo 1 – Aprovação do comitê de ética em Pesquisa Animal.****C E R T I F I C A D O**

Certificamos que a proposta intitulada "Farmacocinética do efavirenz em coelhos: estudo comparativo de formas farmacêuticas sólidas", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 13/2016, sob a responsabilidade de Jonata Augusto de Oliveira e Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad-referendum pela Vice-coordenadora da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 27 de julho de 2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Abril de 2018
Espécie/linhagem/raça	Coelho Neozelandês
Nº de animais	21
Peso/Idade	3 Kg / 6 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central do Câmpus de Botucatu da UNESP

Araraquara, 27 de julho de 2016.


 Profa Dra ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
 Vice-coordenadora da CEUA