

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

EVELIN DOS SANTOS MARTINS

**Farmacocinética do efavirenz administrado na forma
de micropartículas inorgânicas em coelhos**

Araraquara, SP

2018

EVELIN DOS SANTOS MARTINS

**FARMACOCINÉTICA DE EFAVIRENZ
ADMINISTRADO NA FORMA DE MICROPARTÍCULAS
INORGÂNICAS EM COELHOS**

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

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

**Araraquara, SP
2018**

Colocar a folha de aprovação escaneada da cópia original

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, aos meus pais Clóvis e Vanda e ao meu noivo Gustavo, por me ajudarem a chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a vida e, com ela, a oportunidade de realizar nossos sonhos. Agradeço pela Tua presença durante todo este percurso, que me conduziu, animou, deu esperanças e a certeza de que alcançaria esse momento grandioso, apesar das dificuldades.

Aos meus pais Clóvis e Vanda, que instruíram meus caminhos com sabedoria e dedicação. Obrigada por viverem comigo o meu sonho e estarem sempre presentes me incentivando, orientando e orando por mim. Se hoje concluo mais esta etapa da minha vida, é graças ao esforço de vocês, que sempre batalharam para me dar o melhor. Vocês são meus exemplos. Meu amor por vocês é imenso.

Ao meu irmão Vinícius, que apesar da distância, sempre torceu por mim, se alegrou comigo e me ajudou como pôde, consertando meu notebook e até compartilhando o Netflix.

Ao meu noivo Gustavo, por ser meu amigo e confidente que pacientemente escutou meus problemas, sabiamente me aconselhou e carinhosamente me animou sempre que precisei. Durante todos esses anos, tem sido meu fiel companheiro, que por vezes, enfrentou o medo dos coelhinhos para me ajudar.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Rosângela Gonçalves Peccinini, por acreditar e investir na construção do meu conhecimento. Seu amor pela pesquisa e pela docência é inspiração para minha vida profissional. Também não poderia deixar de agradecer pela amizade e pelos conselhos para a vida dados durante as caronas.

Aos meus amigos Jonata Oliveira, Taísa Franchin, Bruna Ulian, Carol Candido, Natália Massu e Anita Fujimoto pela amizade que começou no laboratório e se estendeu para a vida. Somos mais que colegas de trabalho, mais que um grupo de pesquisa, somos amigos. Sem vocês, não seria possível realizar este mestrado e minha vida não seria tão divertida. Obrigada pela ajuda em tudo (dentro e fora do laboratório). Agradeço a Deus por vocês e quero levar essa amizade para vida toda.

Aos colegas Elias Padilha, Michel Campos e Marco Antônio Nogueira, por compartilharem o conhecimento e contribuírem imensamente na minha formação.

Aos funcionários do Laboratório de Bioequivalência, Kelly e Marcos, que prontamente me auxiliaram durante a pesquisa e pelos momentos de descontração na copinha com boas risadas e com as piadas (não tão boas) do Marcão.

Ao Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – LTM), pela parceria que permitiu a realização desta pesquisa.

Ao Dr. Danilo Augusto Ferreira Fontes, pela colaboração e elaboração dos produtos avaliados neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa concedida (processo nº 2015/23843-9).

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, pela infraestrutura disponibilizada para realização do mestrado.

A todos, que me ajudaram e incentivaram durante esta caminhada, pois a tornaram mais leve e feliz.

Mera mudança não é crescimento.
Crescimento é a síntese da mudança e
continuidade, e onde não há continuidade,
não há crescimento.

C.S. Lewis

RESUMO

MARTINS, E. S. **Farmacocinética de efavirenz administrado na forma de micropartículas inorgânicas em coelhos**. 2018. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

Um dos esquemas iniciais da terapia antirretroviral (TARV) da AIDS envolve a administração da associação tenofovir (TDF), lamivudina (3TC) e efavirenz (EFV). O EFV pertence à classe II no Sistema de Classificação Biofarmacêutica e apresenta perfil interindividual variável de biodisponibilidade em humanos devido à influência de fatores como solubilidade aquosa e taxa de dissolução. Esta biodisponibilidade errática contribui para a variabilidade de resposta ao tratamento da doença, o que ressalta a importância do desenvolvimento de formulações que proporcionem o processo de absorção menos susceptível às características interindividuais e mais reprodutíveis em termos de concentrações plasmáticas. Fontes et al. (2016) propuseram a aplicação de hidróxidos duplos lamelares (HDL) como excipientes funcionais em micropartículas inorgânicas para otimizar a taxa de dissolução do EFV, com expectativas de redução da dose e a frequência das administrações, além de diminuição do risco de efeitos adversos por minimização da variabilidade das concentrações plasmáticas. A avaliação do perfil farmacocinético do EFV veiculado pelo sistema HDL proposto em modelo animal é uma importante etapa para propor estudos clínicos. No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método bioanalítico para a determinação de EFV em plasma por UPLC e o método foi aplicado na avaliação da disposição cinética do fármaco administrado em coelhos albinos machos neozelandeses (2,5 - 3,8 kg). Os animais receberam o fármaco em dose única (n=7 por grupo) por administração intravenosa *bolus* [grupo I - 2,7 mg/kg do insumo farmacêutico ativo (IFA) do EFV] e por administração oral na forma de cápsulas [grupo II – IFA do EFV (50 mg); grupo III – EFV (50 mg) veiculado pelo HDL; grupo IV – associação EFV-IFA/TNF/3TC (50 mg, 25 mg e 25 mg, respectivamente); grupo V – associação EFV-HDL/TNF/3TC (50 mg, 25 mg e 25 mg, respectivamente)]. A biodisponibilidade do EFV para o modelo animal foi elevada (100%), o que pode estar relacionado com a elevada taxa de secreção biliar do modelo animal, que minimiza os problemas de solubilidade do ativo. Em todos os grupos que receberam o EFV por via oral foi observada alta variabilidade nas concentrações plasmáticas. A análise farmacocinética não apontou diferenças significativas entre os parâmetros do EFV quando administrado com ou sem HDL, administrado isoladamente ou em associação, sugerindo que não há vantagens na utilização do sistema para a veiculação deste ativo. No entanto, é possível que a investigação em outro modelo animal, como macacos, que apresentam similaridade de secreção biliar com o homem, evidencie benefícios suficientes sobre a solubilidade, como demonstrado nos estudos *in vitro*, que tornem o sistema promissor para a continuidade do desenvolvimento do produto farmacêutico.

Palavras-chave: Antirretroviral. AIDS. Hidróxidos Duplos Lamelares. Perfil farmacocinético

ABSTRACT

MARTINS, E. S. Pharmacokinetics of efavirenz administered in the form of inorganic microparticles in rabbits. 2018. 112 f. Dissertation (Master degree in Pharmaceutical Sciences)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

One of the early AIDS antiretroviral therapy (ART) schemes involves administration of the combination of tenofovir (TDF), lamivudine (3TC) and efavirenz (EFV). EFV is classified as class II on the Biopharmaceutics Classification System (BCS) and presents a variable interindividual profile of bioavailability in humans due to the influence of factors such as aqueous solubility and dissolution rate. This erratic bioavailability contributes to the variability of response to disease treatment, which highlights the importance of developing formulations that makes the absorption process less susceptible to interindividual characteristics and more reproducible in terms of plasma concentrations. Fontes et al. (2016) proposed the application of layered double hydroxides (LDH) as functional excipients in inorganic microparticles to optimize the dissolution rate of EFV, with the expectation of reducing the dose and frequency of administrations, as well as reducing the risk of adverse effects by minimizing the variability of plasma concentrations. The evaluation of the pharmacokinetic profile of the EFV proposed by the animal model is an important step in proposing clinical studies. During this study, a bioanalytical method has been developed and validated for the determination of EFV in plasma by UPLC and this method was applied to evaluate the kinetic disposition of the drug administered in New Zealand male albino rabbits (2.5 - 3.8 kg). Groups were given the single dose (n = 7 per group) by intravenous *bolus* [group I - 2.7 mg/kg of active pharmaceutical ingredient (API) of EFV] and by oral administration in capsule form [group II - API of EFV (50 mg); group III - EFV (50 mg) delivered by LDH; group IV - EFV-API / TNF / 3TC combination (50 mg, 25 mg and 25 mg, respectively); group V - EFV-LDH / TNF / 3TC combination (50 mg, 25 mg and 25 mg, respectively)]. A bioavailability of EFV to the animal model was high (100%), which may be related to a high rate of biliary secretion of animal model, which minimizes the solubility problems of the animal. It was observed high variability in plasma concentrations in all groups receiving oral EFV. Pharmacokinetic analysis didn't reveal meaningful alterations for the performance of EFV when administered with or without LDH, given alone or in combination, suggesting that there are no advantages in using the system for the display of this pharmaceutical active. However, it is possible that investigating other animal model with biliary secretion similar to humans, like monkeys, could point enough benefits on solubility, demonstrated in the *in vitro* studies, that makes the system promising for continuing the development of the pharmaceutical product.

Key words: Antiretroviral. AIDS. Layered Double Hydroxides. Pharmacokinetic profile.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular do efavirenz (EFV).	31
Figura 2 - Principais metabólitos do EFV obtidos no metabolismo hepático de fase 1 e 2.....	35
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura dos HDL (se An- é o íon carbonato e M2+/M3+ é Mg e Al (3:1), o HDL é a hidrotalcita).....	37
Figura 4 - Processo de obtenção do sistema EFV-HDL.	39
Figura 5 - Perfis de dissolução do EFV e dos sistemas EFV-HDL com diferentes proporções.....	40
Figura 6 - Representação esquemática (A) e representação gráfica do decaimento das concentrações (B) no modelo monocompartimental.	45
Figura 7 - Representação esquemática (A) e representação gráfica do decaimento das concentrações (B) no modelo bicompartimental.....	47
Figura 8 - Cromatogramas sobrepostos de amostras branco, zero e de EFV (8 µg/mL).	65
Figura 9 - Cromatogramas de soluções de tenofovir, lamivudina e efavirenz (10 µg/mL).	66
Figura 10 - Curva de calibração de EFV em plasma	67
Figura 11 - Perfil farmacocinético de EFV na administração intravenosa em dose única de 2,7 mg/Kg em coelhos (média ± DP, n = 7).....	71
Figura 12 - Perfil farmacocinético de EFV na administração de 50 mg de EFV-IFA em dose única em coelhos (média ± DP, n = 7).....	73
Figura 13 - Perfil farmacocinético de EFV na administração de 50 mg de EFV-HDL em dose única em coelhos (média ± DP, n = 7).....	75
Figura 14 - Perfil farmacocinético de EFV na administração de 50 mg de EFV-IFA + TNF/3TC em dose única em coelhos (média ± DP, n = 7).	77
Figura 15 - Perfil farmacocinético de EFV na administração de 50 mg de EFV-HDL + 25 mg de TNF/3TC em dose única em coelhos (média ± DP, n = 7).....	79
Figura 16 - Perfis farmacocinéticos dos grupos de animais avaliados (média ± DP, n = 35; n = 7 por grupo).	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos parâmetros farmacocinéticos	63
Tabela 2 - Concentrações da curva de calibração	67
Tabela 3 - Precisão e exatidão do método bioanalítico	68
Tabela 4 - Ensaio de recuperação de EFV em plasma.	69
Tabela 5 - Estabilidade de armazenamento de EFV em plasma.	69
Tabela 6 - Valores de concentração plasmática de EFV versus tempo na administração intravenosa em dose única de 2,7 mg/Kg (média, n = 7, DP= desvio padrão).	70
Tabela 7 - Parâmetros farmacocinéticos da administração IV de EFV em dose única de 2,7 mg/Kg em coelhos (n = 7, média ± IC 95).	71
Tabela 8 - Valores de concentração plasmática de EFV versus tempo na administração de cápsulas de 50 mg de EFV-IFA em coelhos (média, n = 7, DP= desvio padrão).	72
Tabela 9 - Parâmetros farmacocinéticos da administração oral de EFV-IFA em dose única de 50 mg em coelhos (n = 7, média ± IC 95).	73
Tabela 10 - Valores de concentração plasmática de EFV versus tempo na administração de cápsulas de 50 mg de EFV-HDL em coelhos (média, n = 7, DP= desvio padrão).	74
Tabela 11 - Parâmetros farmacocinéticos da administração oral de EFV-HDL em dose única de 50 mg em coelhos (n = 7, média ± IC 95).	75
Tabela 12 - Valores de concentração plasmática de EFV versus tempo na administração de cápsulas de 50 mg de EFV-IFA + TNF/3TC em coelhos (média, n = 7, DP= desvio padrão).	76
Tabela 13 - Parâmetros farmacocinéticos da administração oral de EFV-IFA + TNF/3TC em dose única de 50 mg em coelhos (n = 7, média ± IC 95).	77
Tabela 14 - Valores de concentração plasmática de EFV versus tempo na administração de cápsulas de 50 mg de EFV-HDL+ 25mg de TNF/3TC em coelhos (média, n = 7, DP= desvio padrão).....	78
Tabela 15 - Parâmetros farmacocinéticos da administração oral de EFV-HDL + TNF/3TC em dose única de 50 mg em coelhos (n = 7, média ± IC 95).	79

Tabela 16 - Parâmetros farmacocinéticos de todos os grupos e comparação estatística (média; CV%, n=35, n=7 por grupo).....	81
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

3TC	lamivudina
ABC	abacavir
ADME	absorção, distribuição, metabolização e excreção
ASC	área sob a curva
AZT	azidotimidina/zidovudina
CA	capsídio, p24)
Cl	clearance
Cl _T	clearance total
C _{máx}	concentração plasmática máxima
C _{mín}	concentração plasmática mínima
CQA	controle de qualidade alto
CQB	controle de qualidade baixo
CQD	controle de qualidade diluído
CQM	controle de qualidade médio
CV%	coeficiente de variação
d4T	estavudina
DC	débito cardíaco
ddC	zalcitabina
ddl	didanosina
DMSO	dimetilsulfóxido
DPP	imunocromatografia de dupla migração
DPR	desvio padrão relativo
E	taxa de extração
EFV	efavirenz
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPR	erro padrão relativo
F _{oral}	biodisponibilidade oral
FTC	emtricitabina
gp120	glicoproteína de revestimento viral
HDL	hidróxidos duplos lamelares
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IF	Inibidores de Fusão
IFA	insumo farmacêutico ativo
IFI	imunofluorescência indireta
IgM	imunoglobulina M
IIN	inibidores de Integrase
IN	integrase, p32
IP	inibidores de protease
ITRN	inibidores de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo
ITRNN	inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo
K _a	constante de absorção
K _{el}	constante de eliminação
LD	limite de detecção
LIA	imunoensaios em linha
LIQ	limite inferior de quantificação

Ln	logaritmo natural
Log P	coeficiente de partição
MA	matriz, p17
MAT	tempo de absorção médio
MRT	tempo de residência médio
NC	nucleocapsídeo, p7
PCR	reação de polimerase em cadeia
PD	farmacodinâmica
PI	padrão interno
PK	farmacocinética
PKa	constante de dissociação ácida
PR	protease, p11
SCB	sistema de classificação biofarmacêutica
SEDDS	sistema auto-emulsionável para liberação modificada de fármacos
SIDA/AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SRA	síndrome retroviral aguda
SU	superfície, gp120
T _{1/2}	meia-vida de eliminação
T _{1/2a}	meia-vida de absorção
TARV	terapia antirretroviral
TDF	tenofovir
TGI	trato gastrointestinal
TM	transmembrana, gp41
T _{máx}	tempo para atingir C _{máx}
Tr	tempo de retenção
TR	transcriptase reversa, p66/p51
UPLC	cromatografia líquida de ultra performance
V _{dárea}	volume de distribuição calculado pelo método de área sob a curva
V _c	volume do compartimento central
V _d	volume de distribuição
V _{ss}	volume de distribuição no estado estacionário
WB	western blot
α	constante de distribuição
β	constante de eliminação modelo bicompartimental

SUMÁRIO

1	Introdução	18
2	Fundamentação Teórica	22
2.1	HIV	22
2.1.1	Descoberta e aspectos gerais	22
2.1.2	Ciclo de Replicação do Vírus	23
2.1.3	Fases da infecção pelo HIV e sintomas	24
2.1.4	Forma de transmissão	24
2.1.5	Diagnóstico	25
2.1.6	Terapia antirretroviral	27
2.1.7	Epidemiologia e medidas de controle da doença	30
2.2	Efavirenz	31
2.2.1	Características físico-químicas	31
2.2.2	Indicação terapêutica e posologia	32
2.2.3	Mecanismo de ação	32
2.2.4	Farmacocinética de EFV	33
2.3	Novas formulações de efavirenz	36
2.3.1	Hidróxidos Duplos Lamelares	37
2.3.2	Sistema EFV-HDL	39
2.4	Farmacocinética	41
2.4.1	Processos e parâmetros farmacocinéticos	41
2.4.2	Modelos farmacocinéticos	44
2.4.3	Ordem cinética	47
2.3.4	Farmacocinética pré-clínica no desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos	48
2.5	Modelo animal	48
3	Objetivos	52
3.1	Objetivo geral	52
3.2	Objetivos específicos	52
4	Materiais e Métodos	53
4.1	Matéria-prima, reagentes e solventes	53
4.2	Equipamentos	53

4.3	Correlatos	53
4.4	Softwares	54
4.5	Desenvolvimento do método bioanalítico	54
4.5.1	Sistema Cromatográfico	54
4.5.2	Preparo da amostra	54
4.6	Validação do método bioanalítico	55
4.7	Protocolo Experimental	58
4.7.1	Modelo Animal	58
4.7.2	Cápsulas de EFV	59
4.7.3	Cálculo amostral	60
4.7.4	Administração por via oral	61
4.7.5	Administração intravenosa	61
4.7.6	Coleta de sangue	62
4.7.7	Análise farmacocinética	62
4.7.8	Análise estatística	64
5	Resultados	65
5.1	Validação de método bioanalítico em plasma de coelhos	65
5.1.1	Seletividade	65
5.1.2	Curva de calibração	66
5.1.3	Precisão e exatidão	68
5.1.4	Efeito Residual	68
5.1.5	Recuperação	68
5.1.6	Estabilidade de armazenamento	69
5.2	Análise Farmacocinética	70
5.2.1	Grupo farmacocinética I (administração intravenosa de EFV)	70
5.2.2	Grupo farmacocinética II (administração oral de EFV-IFA)	72
5.2.3	Grupo farmacocinética III (administração oral de EFV-HDL)	74
5.2.4	Grupo farmacocinética IV (administração oral de EFV-IFA associado a TNF e 3TC)	76
5.2.5	Grupo farmacocinética V (administração oral de EFV-HDL associado a TNF e 3TC)	78
5.3	Discussão dos resultados e comparação estatística	80
5.3.1	Clearance plasmático (Cl)	82

5.3.2 Volume de distribuição (Vd)	83
5.3.3 Meia-vida de eliminação ($T_{1/2}$) e constante de eliminação (K_{el})	83
5.3.4 Tempo de residência médio (MRT), tempo de trânsito médio (MTT), tempo de absorção médio (MAT) e tempo para início da absorção (T_{lag}).	85
5.3.5 Concentração plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) e tempo para atingir $C_{m\acute{a}x}$ ($T_{m\acute{a}x}$)	86
5.3.6 Avaliação da biodisponibilidade absoluta (F_{oral})	87
6 Conclusão parciais e perspectivas	89
Refêrencias	90
Apêncide A - Resultados individuais do grupo I	101
Apêncide B - Resultados individuais do grupo II	102
Apêncide C - Resultados individuais do grupo III	103
Apêncide D - Resultados individuais do grupo IV	104
Apêncide E - Resultados individuais do grupo V	105
Anexo A – Protocolo CEUA/FCF/CAr	106

1 Introdução

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é o estágio mais avançado da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) que é transmitido através de relações sexuais desprotegidas; transfusão de sangue e compartilhamento de agulhas contaminadas, seringas ou outros instrumentos cortantes. Também é possível ocorrer a transmissão vertical durante o período de gestação, parto e aleitamento materno (BRASIL, 2015b).

O HIV infecta células do sistema imune, especialmente os linfócitos T CD4+, e pode provocar uma deterioração progressiva, levando a "deficiência imunológica" (CDC, 2015). O sistema imunológico é considerado deficiente quando sua capacidade de combater as infecções e doenças é prejudicada. Por isto, é comum ocorrer infecções associadas com a imunodeficiência adquirida, as chamadas "infecções oportunistas", pois os agentes infecciosos encontram um ambiente mais susceptível para o seu desenvolvimento quando o sistema imunológico está enfraquecido (WHO, 2015). Até 2013, mais de 35 milhões de pessoas viviam com HIV/AIDS em todo mundo, e mais de 1,5 milhões de pessoas morreram com doenças relacionadas a AIDS (WHO, 2015). Por isso, é importante diagnosticar precocemente a infecção pelo HIV, para que os soropositivos iniciem o tratamento adequado e, assim, melhorem a expectativa e qualidade de vida (BRASIL, 2015a).

A terapia antirretroviral (TARV) tem como objetivo diminuir a morbidade e mortalidade das pessoas com HIV/AIDS, uma vez que estes fármacos não são capazes de erradicar a infecção pelo HIV. O tratamento de primeira linha proposto pelo "Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos" formulado pelo Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde estabelece a combinação de três antirretrovirais, sendo dois inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídicos (ITRN) e um inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídicos (ITRNN). Dessa forma, o esquema de terapia inicial consiste na administração de tenofovir (TDF) e lamivudina (3TC) como ITRN; e efavirenz (EFV) como ITRNN. Vários fatores foram importantes na escolha dos três medicamentos. Um fator preponderante foi a notória preferência do uso de EFV como opção inicial de ITRNN nos esquemas de tratamento e também

pelo uso de TDF, como uns dos ITRN, ser considerado cada vez mais uma opção segura de primeira linha (BRASIL, 2015c).

O antirretroviral efavirenz é o ITRNN mais utilizado clinicamente devido à sua potente atividade antiviral e eficácia clínica quando combinado com dois ITRN de terapia de primeira linha (GULICK et al., 2006).

É comercializado com os nomes de Sustiva® (Bristol-Myers Squibb) nas formas farmacêuticas de cápsulas gelatinosas nas doses de 50 mg, 100 mg e 200 mg e comprimidos na dosagem de 600 mg (DRUGBANK, 2015); e Stocrin nas formas farmacêuticas de cápsulas nas dosagens de 50 mg, 100 mg e 200 mg, comprimidos revestidos na dosagem de 50 mg, 200 mg e 600 mg e solução oral na dosagem de 30 mg/mL (Merck Sharp & Dohme) (MICROMEDEX, 2015). Em 2007, o governo brasileiro decretou a licença compulsória da patente do EFV que pertence a Merck Sharp & Dohme. Com isso, a produção local desse fármaco e da formulação correspondente foi viabilizada. Atualmente, o Laboratório Nacional Farmanguinhos e o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) estão encarregados da produção do medicamento efavirenz, cujo insumo farmacêutico (IFA) é produzido pelas empresas Globequímica, Cristália e Nortec (BRASIL, 2012).

O EFV pertence à classe II no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) por apresentar alta permeabilidade e baixa solubilidade em água (8,3 µg/mL em pH 1-8) (CRISTOFOLETTI et al., 2013). A biodisponibilidade oral (F_{oral}) absoluta do EFV em humanos apresenta um perfil variável entre indivíduos devido a influência de fatores como solubilidade aquosa e taxa de dissolução (SAVJANI et al., 2012). Entretanto, Balani e colaboradores (1998), em estudos pré-clínicos, observaram biodisponibilidade em ratos e macacos de 16% e 42%, respectivamente, após a administração de suspensão oral.

Os efeitos adversos mais comuns observados em estudos de segurança e tolerância ao EFV são os efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC), sintomas psiquiátricos e erupções cutâneas. De 1008 pacientes que receberam medicamentos contendo EFV, quase 53% relataram sintomas relacionados aos efeitos centrais como tontura, insônia e alucinações; dos quais 2% foram classificados como graves e resultaram na interrupção do tratamento. Os sintomas psiquiátricos com frequência maior que 2% foram depressão, ansiedade e nervosismo (FDA, 2005). Os efeitos adversos sobre o SNC estão associados a níveis elevados de EFV no sangue e

tendem a ser mais prevalente em pacientes com concentrações maiores que 4 µg/mL (MARZOLINI et al., 2001). Quanto às reações cutâneas, 26% dos adultos e 45% dos pacientes pediátricos desenvolvem erupções cutâneas maculopapulares de algum grau, justificando a interrupção do tratamento em 1,7% dos adultos e 8,8% das crianças, contudo, no restante dos pacientes, as reações desaparecem com a continuação do tratamento (FDA, 2005).

A sobredosagem de EFV é incomum. Nos casos de intoxicação aguda, não são descritas sequelas graves e os sintomas apresentados são semelhantes aos que ocorrem em doses terapêuticas, como agitação psicomotora e irritabilidade (FDA, 2005).

Farmacocinética não linear foi relatada no estudo de Balani e colaboradores (1998) em que se observou redução do clearance (Cl) após alta dose intravenosa (15 mg/kg) em ratos e macacos, indicando saturação do metabolismo. Outro fato observado foi o aumento desproporcional na área sob a curva (ASC) em doses elevadas administradas pela via oral, sugerindo prolongamento da absorção. 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 (TOUTAIN e BOUSQUET-MELÓU et al.; 2004d), o que ressalta a importância do desenvolvimento de formulações que proporcionem melhores condições de solubilização *in vivo* do fármaco para tornar o processo de absorção menos susceptível às características interindividuais e mais reprodutíveis em termos de concentrações plasmáticas obtidas.

É um grande desafio desenvolver formulações inovadoras para o EFV que sejam capazes de promover alta biodisponibilidade com menores doses. A tecnologia farmacêutica oferece muitas estratégias para isso e pesquisadores em todo mundo tem trabalhado nesta direção. Avachat e Parpani (2015) delinearam um sistema de liberação oral com micropartículas de cristais líquidos (cubossomas) composto por fitantriol, tendo EFV incorporado para promover sua liberação controlada no meio aquoso. O produto delineado foi vantajoso, pois melhorou a solubilidade do EFV em água e aumentou significativamente a biodisponibilidade do fármaco, demonstrando que houve correlação *in vitro/in vivo*. Kotta e colaboradores (2014) também avaliaram a correlação *in vitro/in vivo* de uma nanoemulsão formulada com monocaprilato de propilenoglicol como fase oleosa. A nanoemulsão de EFV atingiu o objetivo de

melhorar a biodisponibilidade e reduzir a variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos. No Brasil, o Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM), do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), tem trabalhado com o desenvolvimento de novas formulações para a terapia anti-HIV. Dentre as pesquisas realizadas, está a de Vieira (2011) que obteve e caracterizou o complexo de inclusão com ciclodextrinas, assim como, a formação de sistema de multicomponentes de ciclodextrinas com polímeros hidrofílicos para incrementar a solubilidade aquosa de EFV; e a pesquisa de Fontes e colaboradores (2016), que utilizou hidróxidos duplos lamelares (HDL) como excipientes funcionais em micropartículas inorgânicas com o objetivo de otimizar a taxa de dissolução e aumentar a biodisponibilidade, com perspectivas de reduzir a dose e a frequência das administrações, além de diminuir o risco de efeitos adversos.

Diante do exposto, particularmente considerando a expectativa de um perfil de absorção mais efetivo e homogêneo para o novo produto proposto, este trabalho teve a finalidade de avaliar a farmacocinética de EFV veiculado por uma micropartícula inorgânica complexada com EFV (EFV-HDL) e comparou com a farmacocinética do ativo livre.

A execução deste trabalho resultou em informações que permitem verificar se há vantagens do ponto de vista farmacocinético que justifique a continuidade do desenvolvimento do novo produto.

2 Fundamentação Teórica

2.1 HIV

2.1.1 Descoberta e aspectos gerais

A identificação do vírus associado a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foi feita em 1983 pelos virologistas franceses Françoise Barré-Sinoussi e Luc Montagnier. A descoberta do vírus, que mais tarde tornou-se conhecido como Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), ocorreu em meio a intenso esforço global para encontrar a causa da nova epidemia após os primeiros relatos de casos de AIDS (NOBEL, 2008; BARRÉ-SINOUSSE et al, 2013).

A epidemia de HIV surgiu após infecções zoonóticas com vírus da imunodeficiência de símio a partir de primatas africanos e acredita-se que os primeiros a serem infectados foram os consumidores de carne de animais selvagens (MAARTENS et al, 2014). O HIV é um vírus que pertence à família *Retroviridae* e à subfamília *Lentiviridae*, sendo considerado altamente evoluído porque pode replicar-se em células hospedeiras pelo processo de transcrição reversa. Existem dois tipos principais de HIV: HIV-1 e HIV-2 (menos comum). Os tipos de vírus podem ser facilmente distinguidos por diferenças de reatividade do anticorpo para a glicoproteína de envelope (gp 120) (BARON, 1996; IWEALA, 2004).

O principal alvo do HIV são os linfócitos T CD4 ativados e a infecção depende da interação de alta afinidade entre células que expressam o receptor CD4 e a glicoproteína de superfície do HIV, levando a uma perda progressiva dessas células. Isto gera desregulação imunológica e perda de competência imunológica em indivíduos infectados, correlacionando-se com a ocorrência de infecções oportunistas e desenvolvimento de AIDS (BOUR et al, 1995; MAARTENS et al, 2014).

O genoma do HIV codifica as principais enzimas estruturais e não estruturais. Existem três genes estruturais *gag* (grupo específico de antígeno), *env* (glicoproteína do envelope) e *pol* (polimerase) comuns aos retrovírus, os genes regulatórios *tat*, *rev* e *nef*, e, ainda, os genes acessórios *vif*, *vpr* e *vpu* (HIV-1) ou *vpx* (HIV-2). Os genes estruturais codificam as poliproteínas *gag*, *env* e *pol*, que são subsequentemente clivadas pelas proteases virais em proteínas individuais (FREED, 2001).

Os componentes estruturais que formam o capsídeo e o envelope viral são as quatro proteínas *gag*, MA (matriz, p17), CA (capsídeo, p24), NC (nucleocapsídeo, p7) e p6; e as duas glicoproteínas *env*, SU (superfície, gp120) e TM (transmembrana, gp41). As três proteínas *pol* possuem funções enzimáticas essenciais e são encapsuladas com a partícula viral, são elas: PR (protease, p11), TR (transcriptase reversa, p66/p51) e IN (integrase, p32) (FERREIRA et al.; 2010).

2.1.2 Ciclo de Replicação do Vírus

O ciclo de replicação do HIV inicia com a adsorção de partículas virais na superfície dos linfócitos T CD4+ através da interação específica entre a glicoproteína de revestimento viral (gp120) e o domínio N-terminal da molécula CD4. Entretanto, apenas esta interação não é suficiente para a entrada do HIV na célula, sendo necessária a ligação entre a gp120 com os co-receptores CCR5 ou CXCR4 sobre a superfície da célula alvo (KOROLEV et al., 2011; BARRÉ-SINOUSSE et al., 2013). Após a ligação da gp120 com os co-receptores, ocorre uma alteração conformacional e a glicoproteína gp41 é incorporada na membrana celular, resultando na fusão do revestimento viral e da membrana celular, produzindo um poro através do qual o núcleo viral penetra no citoplasma da célula (FREED, 2001; MARTEENS et al., 2014). Após a fusão, o vírus perde seu revestimento, e o processo de transcrição reversa começa. A transcrição reversa do RNA genômico é realizada por meio da enzima viral, transcriptase reversa (TR), no citoplasma. O produto da transcrição reversa, o DNAc de cadeia dupla, é transportado para o interior do núcleo pelo complexo de pré-integração, a qual compreende uma série de proteínas virais, tais como a integrase (IN), a proteína da matriz (MA), a transcriptase reversa, a nucleocápside proteína (NC), e a proteína reguladora Vpr (proteína viral R) (FERREIRA et al., 2010). Depois de ser transportada para o núcleo, uma cópia de DNA é integrada, isto é, covalentemente incorporada no genoma da célula hospedeira devido à atividade catalítica da IN. Então, o HIV-1 inicia a expressão regulada do genoma pró-viral; em seguida, ocorre o processamento de proteínas virais sintetizadas pela protease viral, seguindo-se a montagem de novos vírions, que são libertados a partir da célula para infectar novas células alvo, encerrando o ciclo de vida do vírus (FREED, 2015).

2.1.3 Fases da infecção pelo HIV e sintomas

A infecção pelo HIV-1 percorre um amplo espectro de apresentações clínicas, desde a fase aguda até a fase avançada da doença. A fase aguda ocorre durante as primeiras semanas da infecção até o aparecimento dos anticorpos anti-HIV (soroconversão), que costuma ocorrer em torno da quarta semana. Muitas pessoas desenvolvem a Síndrome Retroviral Aguda (SRA) e os sintomas incluem febre, adenopatia, faringite, exantema, mialgia e cefaleia. A SRA é autolimitada e a maior parte dos sinais e sintomas desaparece de três a quatro semanas. Durante este período inicial da infecção, uma grande quantidade de vírus está sendo produzida e o indivíduo torna-se altamente infectante (BRASIL, 2015; CDC, 2016).

A fase de latência clínica, às vezes chamada de infecção por HIV assintomática, é caracterizada pela reprodução do HIV em níveis mais baixos, mas sendo ainda ativo. À medida que a infecção avança, os sintomas constitucionais como febre baixa, perda de peso ponderal, sudorese noturna e fadiga tornam-se mais frequentes. Nesse período, a carga viral de uma pessoa começa a subir e já é possível encontrar diminuição na contagem de linfócitos T CD4+, progredindo para AIDS (USA, 2016).

A AIDS é a fase mais avançada da infecção pelo HIV e ocorre quando o sistema imunológico está seriamente danificado, tornando o organismo vulnerável a infecções oportunistas e neoplasias. Entre as infecções oportunistas destacam-se: tuberculose pulmonar atípica ou disseminada, meningite criptocócica e retinite por citomegalovírus. As neoplasias mais comuns são sarcoma de Kaposi, linfoma não Hodgkin e câncer de colo uterino, em mulheres jovens (IWEALA, 2004; BRASIL, 2015).

2.1.4 Forma de transmissão

O HIV está presente nos fluidos corporais como sangue, sêmen, fluidos vaginais, fluidos retais e leite materno. Estes fluidos têm de entrar em contato com as membranas mucosas ou tecido danificado ou penetrar diretamente na corrente sanguínea a partir de uma agulha ou seringa para ocorrer a transmissão do vírus. Geralmente, acontece a transmissão horizontal através de relações sexuais desprotegidas, compartilhamento de drogas injetáveis, e também pode ocorrer após

transfusão de sangue ou transplante de órgãos de um doador infectado pelo HIV. O HIV pode ser transferido a partir da mãe infectada para o bebê, este tipo de transmissão é conhecido como vertical (BARON, 1996; CDC, 2015).

2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico sorológico da infecção por HIV é obtido por meio da detecção de anticorpos para HIV no sangue ou em outros fluidos corporais. Os anticorpos geralmente aparecem entre a terceira e sexta semana após a infecção. Durante a janela imunológica, período em que os anticorpos não são detectados, o diagnóstico do HIV pode não ser feito de forma precisa, utilizando testes que se baseiam apenas em anticorpos. Não obstante os esforços da comunidade científica, ainda não existem métodos analíticos ou biomarcadores que possam ser utilizados para diagnóstico neste período de ocorrência da janela imunológica (WHO, 2013).

O principal teste utilizado no diagnóstico sorológico do HIV é o ensaio imunoenzimático, conhecido como ELISA (do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Nas últimas décadas, foram desenvolvidas quatro gerações de ensaios imunoenzimáticos. O ensaio de primeira geração utilizava lisados virais como antígenos e o de segunda geração empregava antígenos mais específicos na forma de peptídeos sintéticos ou proteínas recombinantes, entretanto, ainda não identificavam respostas precoces de anticorpos na forma de IgM (imunoglobulina M). O ensaio de terceira geração tem o formato “sanduíche” e adicionou a detecção de IgM. A característica desse ensaio é utilizar antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos tanto na fase sólida quanto sob a forma de conjugado. Por último, o ensaio de quarta geração detecta simultaneamente o antígeno viral p24 e anticorpos específicos anti-HIV, sendo no formato “sanduíche” também. Essa técnica é amplamente utilizada como teste inicial para detecção de anticorpos contra o vírus, devido à sua alta sensibilidade (CDC, 2014; ALEXANDER, 2016).

Apesar dos ensaios serem muito sensíveis e específicos, resultados falso-positivos ou falso-negativos podem ocorrer. Os ensaios confirmatórios foram desenvolvidos para certificar os resultados positivos iniciais e incluem os ensaios de imunofluorescência indireta (IFI), western blot (WB) ou u ensaios em linha (LIA) (WHO, 2013).

O ensaio de IFI consiste na reação de soros ou plasmas humanos com células infectadas pelo HIV fixadas em lâminas de microscopia de fluorescência. A reação entre o antígeno fixado e o anticorpo presente nas amostras é visualizada após a adição de anti-imunoglobulina humana (Ig), conjugada com isotiocianato de fluoresceína e a leitura da reação é feita em microscópio de fluorescência. A IFI foi muito utilizada como teste complementar durante a primeira década da epidemia de HIV, mas atualmente foi substituída pelo WB e LIA. (LENNETTE et al, 1987; IWEALA, 2004).

O ensaio de WB envolve a separação de uma mistura de proteínas virais com base no peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguida da transferência eletroforética dos antígenos para uma membrana de nitrocelulose. A membrana é incubada com o soro do paciente, onde as reações antígeno-anticorpo são detectadas por meio da reação com anti-imunoglobulina humana, conjugada com uma enzima. Após uma reação de oxirredução e de precipitação, as proteínas virais são visualizadas sobre a fita de nitrocelulose. Esse teste é utilizado para confirmação do resultado reagente ao teste Elisa e apresenta alta especificidade e sensibilidade (MAHMOOD et al., 2012). O ensaio de LIA é similar ao ensaio de WB, mas utiliza proteínas ou peptídeos recombinantes purificados, imunologicamente importantes para o diagnóstico. Os WB e LIA são caros e requerem interpretação para estabelecer um diagnóstico baseado na combinação de anticorpos para antígenos específicos presentes no sangue (WHO, 2013).

O HIV também pode ser diagnosticado por meio da detecção direta do vírus ou de componentes virais (antígeno p24, RNA ou DNA pró-viral). A detecção do antígeno p24 ou do RNA ou DNA do HIV desempenha um papel importante quando não é possível realizar o diagnóstico com base em anticorpo, como em crianças expostas no momento perinatal ou a detecção de infecção aguda em adultos antes do desenvolvimento de anticorpos para HIV (BRASIL, 2013). A detecção direta do vírus ou de componentes virais é feita através de tecnologias de amplificação molecular, como o PCR (do inglês, Polymerase Chain Reaction), uma ferramenta única para um diagnóstico mais direto e de maior sensibilidade na infecção por HIV (HAMMER, 1993). O método baseia-se na amplificação de ácido nucleico que permite a detecção de DNA viral integrado no DNA genômico de células do hospedeiro ou a detecção de RNA no sangue (como um componente de partículas virais livres e RNA intracelular).

Além do teste diagnóstico de HIV, laboratórios podem também oferecer teste de PCR quantitativo de RNA (carga viral), que é usada para ajudar a determinar o início da terapia e monitorar a eficácia da terapia (HART et al.1988, FEARON, 2005).

A amplificação do acesso ao diagnóstico é um desafio aos programas de saúde pública. Os testes laboratoriais convencionais são mais complexos operacionalmente, exigem profissionais especializados, laboratório com infraestrutura física e máquinas apropriadas. Também, o prazo para entrega dos resultados dos testes pode ser longo, levando o indivíduo a desistir do resultado do teste e à conseguinte perda deste pelo sistema de saúde (BRASIL, 2013).

Os testes rápidos são ensaios imunoenzimáticos simples cuja execução, leitura e interpretação dos resultados são realizados em até 30 minutos. Há vários formatos de testes rápidos e os mais utilizados são: dispositivos (ou tiras) de imunocromatografia (ou fluxo lateral), imunocromatografia de dupla migração (DPP) e dispositivos de imunoconcentração e fase sólida. Podem ser realizados com fluido oral, soro, plasma ou sangue total (o que permite o uso de amostras obtidas por punção digital). Com isso, o diagnóstico do HIV atualmente pode ser realizado em ambientes laboratoriais e não laboratoriais, permitindo ampliar o acesso ao diagnóstico (IWEALA, 2004; WHO, 2013; ALEXANDER, 2016).

2.1.6 Terapia antirretroviral

A descoberta e implantação da terapia antirretroviral (TARV) para a infecção pelo HIV é uma das realizações mais extraordinárias na história recente da medicina (FAUCI et al., 2014). Somente quando o HIV foi identificado como o vírus responsável pela doença e teve seu ciclo de vida caracterizado, as comunidades médicas e científicas foram capazes de começar a investigar abordagens de antirretrovirais (BARRÉ-SINOUSI et al, 2013).

Os principais alvos previstos foram: a transcrição reversa, catalisada pela transcriptase reversa (TR) (DNA polimerase RNA-dependente), uma enzima viral específica que faz transcrição reversa do RNA viral de cadeia simples para DNA viral de cadeia dupla; o processamento proteolítico pela protease viral, que cliva a proteína viral precursora em proteínas virais maduras menores; a fusão de células com vírus e interação do vírus com os seus co-receptores; e a integração do DNA viral ao genoma

da célula hospedeira, um processo realizado por uma enzima viral específica, a integrase, que determina se a célula infectada com HIV e todas as células filhas resultantes carregarão o material genético do vírus (DE CLERCQ, 2009).

Desta forma, a classificação dos agentes antirretrovirais é dividida de acordo com as enzimas que inibem: Inibidores de Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídicos (ITRNs), Inibidores de Transcriptase Reversa Não-Análogo de Nucleosídicos (ITRNNs), Inibidores de Protease (IP), Inibidores de Fusão (IF), Inibidores de Integrase (IIN) (PEÇANHA et al., 2002).

A inibição da enzima transcriptase reversa (TR) foi primeiro alvo a ser testado, devido à ausência de uma enzima análoga à TR em células humanas e o conhecimento prévio de inibidores de TR, utilizados no tratamento de retrovíroses animais (SHIMADA et al., 1994). Em 1987, a azidotimidina (AZT) foi o primeiro antirretroviral aprovado para uso clínico, demonstrando em ensaio clínico a diminuição da mortalidade e de infecções oportunistas em pacientes com AIDS (FISCHL et al., 1987). O AZT era sintetizado inicialmente como um agente antitumoral, porém verificou-se também que era capaz de bloquear o passo de transcrição reversa do ciclo de vida do HIV-1, sendo classificado como um inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídico (ITRN). No entanto, a resistência viral foi rapidamente desenvolvida, e assim novos fármacos tiveram de ser desenvolvidos tendo como alvo o ciclo de replicação do vírus (BARRÉ-SINOUSSE et al, 2013).

Isto estimulou a avaliação da atividade anti-HIV de diversos ITRNs e atualmente existem sete aprovados, além do AZT: didanosina (ddl), zalcitabina (ddC), estavudina (d4T), lamivudina (3TC), emtricitabina (FTC) tenofovir (TDF) e abacavir (ABC) (FDA, 2016). Estes fármacos precisam ser fosforilados intracelularmente, convertendo-os para sua forma 5'- trifosfato, para que possam interagir com o sítio de ligação do substrato de TR do HIV e assim, atuar como um inibidor competitivo ou um substrato alternativo de TR. Se o inibidor for incorporado à cadeia de DNA, torna-se impossível a continuidade do crescimento desta e assim, os ITRNs atuam como terminadores de cadeia (DE CLERCQ, 1995).

A classe dos Inibidores de Transcriptase Reversa Não-Análogo de Nucleosídicos (ITRNNs) apresenta uma vantagem principal sobre os ITRNs, pois não necessitam de uma etapa inicial de ativação intracelular, como por exemplo a fosforilação. Os ITRNNs não interagem com o sítio de ligação do substrato de TR,

mas sim com um sítio de ligação alostérico, fixando a enzima em uma conformação inativa (BÉTHUNE, 2010). A interação cooperativa entre estes dois locais proporciona uma lógica para aumentar a eficácia dos ITRNs e ITRNNs e usá-los em terapia de combinação (DE CLERCQ, 2004). Os primeiros ITRNNs a serem descobertos foram os compostos HEPTe TIBO, que apresentaram a alta potência e especificidade na inibição da TR do HIV-1 (DE CLERCQ, 1995). Atualmente, são estes os compostos que aprovados para o tratamento da infecção por HIV: nevirapina, delavirdina, efavirenz, etravirina e rilpivirina (FDA, 2016).

A classe dos inibidores de protease (IP) aborda o princípio "peptídeomimético", isto é, os fármacos contêm uma sequência sintética que imita uma ligação peptídica normal, mas que não é hidrolisável pela enzima. Assim, eles impedem a protease do HIV de realizar sua atividade enzimática, que é o processamento proteolítico de proteínas virais precursoras em proteínas virais maduras. Os antirretrovirais disponíveis para uso são saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir e darunavir (DE CLERCQ, 2009).

A classe de inibidor de fusão (IF) tem como estratégia impedir o processo de fusão vírus-célula, mediado pela gp 41. O único antirretroviral disponível para o tratamento de infecções por HIV é o enfuvirtida, que é um polipeptídeo de 36 aminoácidos que interage com a gp41 e impede a fusão vírus célula, bloqueando assim a infecção (DE CLERCQ, 2009).

A classe dos inibidores de integrase (IIN) tem-se apresentado como um potencial alvo para o desenvolvimento de novos compostos anti-HIV e tem como mecanismo impedir que, após o DNA ter sido formado no citoplasma pela TR viral, seja integrado no DNA genômico do hospedeiro com o auxílio da IN (KOROLEV et al., 2011). O primeiro inibidor de integrase licenciado para uso clínico foi o raltegravir, aprovado em 2007, e recentemente o dolutegravir em 2013 (FDA, 2016).

No final da década de 90, foi introduzida a terapia antirretroviral que combina dois inibidores de transcriptase reversa análogos a nucleosídeo (emtricitabina ou lamivudina em conjunto com um de abacavir, tenofovir ou zidovudina) com um inibidor de transcriptase reversa não análogo a nucleosídeo ou um inibidor de integrase ou um inibidor de protease (BARRÉ-SINOUSI et al., 2013; MARTEENS, 2014). Deste modo, é possível suprimir profundamente a replicação viral, com a consequente reposição de células CD4+, o que traz benefícios evidentes para a diminuição da

morbidade e mortalidade associada a AIDS, melhorando a qualidade de vida dos pacientes (PALELLA et al., 1998; BARTLETT et al., 2006; MARTEENS, 2014).

É indicado iniciar imediatamente a TARV em todos os indivíduos sintomáticos, independentemente da contagem de linfócitos T CD4+ (BRASIL, 2015c). Para os pacientes assintomáticos, a *World Health Organization* (WHO) estabeleceu em 2013 uma nova diretriz de tratamento do HIV que recomenda o início do tratamento em pacientes com contagem de células T CD4+ igual ou inferior a 500 células/mm³, quando o sistema imune ainda está forte. Esta recomendação é baseada na evidência de que o tratamento precoce de pessoas com HIV, pode mantê-los mais saudáveis e reduzir a quantidade de vírus no sangue, o que reduz o risco de passá-lo para outro indivíduo. Em pacientes com contagem de linfócitos T CD4+ superior a 500 células/mm³ e carga viral superior a 100.000 cópias/mL, recomenda-se monitorização laboratorial frequente e considerar início de TARV quando os linfócitos CD4+ estiverem próximo a 500 células/ mm³ (BRASIL, 2015c).

2.1.7 Epidemiologia e medidas de controle da doença

O mundo tem lutado para conter a propagação do HIV. Novas infecções e mortes relacionadas com a AIDS tem diminuído notavelmente desde o pico da epidemia (UNAIDS, 2016). Em 2014, 36,9 milhões de pessoas em todo o mundo viviam com HIV. O número de pessoas vivendo com o HIV continua a aumentar, em grande parte porque mais pessoas globalmente tem acesso a terapia antirretroviral e como resultado estão vivendo mais tempo e com qualidade de vida. Até o começo de 2015, 15,8 milhões de pessoas tinham acesso ao tratamento. Apesar disso, em 2014, cerca de 2 milhões de pessoas foram infectadas com o HIV e 1,2 milhões pessoas morreram de doenças relacionadas com a AIDS (UNAIDS, 2015).

No Brasil, desde o início da epidemia de AIDS em 1980 até junho de 2016, foram registrados 842.710 casos da doença e, até dezembro de 2015, foram registrados 303.353 óbitos cuja causa básica foi a AIDS. Anualmente, uma média de 41,1 mil novos casos são registrados no país. Os casos de AIDS estão distribuídos principalmente nas regiões sudeste (53%) e sul (20,1%), no sexo masculino (65,1%) e na faixa etária de 25 a 39 anos para ambos os sexos. A taxa de detecção de AIDS tem-se estabilizado nos últimos 10 anos e a taxa de mortalidade por AIDS apresentou

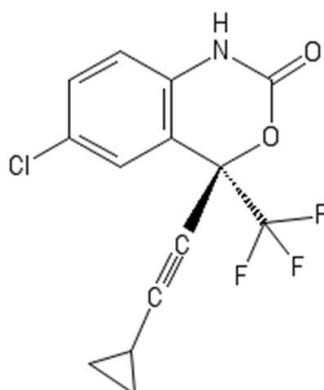
uma leve queda no coeficiente de mortalidade padronizado, porém um aumento importante de óbitos tem sido observado em alguns estados brasileiros (BRASIL, 2016).

2.2 Efavirenz

2.2.1 Características físico-químicas

EFV foi descoberto pelos pesquisadores da Merck e desenvolvido em conjunto pela DuPont e Merck. O fármaco apresenta-se como pó cristalino branco ligeiramente rosa, com massa molecular de 315,68 g/mol e ponto de fusão entre 138-142°C. Seu nome químico é (4S)-6-cloro-4-(2-ciclopropiletinil)-4-(trifluorometil)-1H-3,1-benzoxazin-2-ona. A fórmula empírica do EFV é $C_{14}H_9ClF_3NO_2$ e sua fórmula estrutural é (WHO, 2005):

Figura 1 - Estrutura molecular do efavirenz (EFV).



Fonte: do autor (2018).

A estrutura molecular de EFV apresenta um carbono quiral no anel benzoxazin-2-ona na configuração S. A potente atividade inibitória sobre a transcriptase reversa do HIV está relacionada ao enantiômero-(S), enquanto que, o enantiômero-(R), foi inativo no ensaio de inibição *in vitro* da TR (YOUNG et al., 1995).

O EFV existe em várias formas cristalinas que foram caracterizadas por difração de raio-X e calorimetria exploratória diferencial e são designadas como formas 1, 2, 3, 4 e 5. A forma 1 representa a forma substancialmente pura obtida após

síntese e a mais estável termodinamicamente, sendo comumente utilizada em formulações (RADESCA et al., 1999).

A solubilidade intrínseca de EFV é de 8,3 µg/mL (faixa de pH 1-8, somente espécies não-ionizadas), sendo praticamente insolúvel em água. Entretanto, a solubilidade aquosa pode ser incrementada com aumento do pH (pH≥10), através da ionização do grupo amina do carbamato que é desprotonado. A constante de dissociação ácida (pKa) da molécula foi determinada por estudos de solubilidade em função do pH e espectrofotometria, apresentando um valor de 10,2 (RABEL et al., 1996). O valor de coeficiente de partição (Log *P*), determinado por ALMOND et al. (2005) através do método shake-flask água/n-octanol, é de 2,07 ±0,12; KASIM et al. (2003) relatam os valores estimados de Log *P* de 3,68 através de simulações computacionais. Os estudos de permeabilidade em monocamada de células Caco-2 indicam que EFV é altamente permeável, apresentando um coeficiente de permeabilidade aparente de 8,92 x 10⁻⁶cm.s⁻¹ (TAKANO et al., 2006).

De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), EFV pertence à classe II por ser um composto com alta permeabilidade, mas baixa solubilidade aquosa e com absorção limitada pela taxa de dissolução (KASIM et al., 2003; CHIAPPETTA et al., 2010; CRISTOFOLETTI et al., 2012).

2.2.2 Indicação terapêutica e posologia

Efavirenz é um inibidor de transcriptase reversa não-análogo de nucleosídicos (ITRNN) indicado para terapia antirretroviral combinada de adultos, adolescentes e crianças com idade igual e superior a 3 anos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Em adultos, a dose recomendada de EFV em associação com ITRNs é de 600 mg por via oral, uma vez por dia. Em pacientes com 3 meses até 17 anos de idade, a dose de EFV em associação com ITRNs é ajustada de acordo com o peso corporal, podendo alcançar até 600 mg, uma vez ao dia, ou 200 mg, três vezes ao dia (EMA, 2016).

2.2.3 Mecanismo de ação

EFV é uma benzoxazinona do grupo dos ITRNNs que atua como inibidor não competitivo de TR do HIV-1. Seu mecanismo de ação é dado pela interrupção da

transcrição reversa do RNA viral para DNA, etapa crucial para a replicação do HIV, devido a ligação do fármaco com o sítio de ligação alostérico da enzima TR do HIV-1, o que bloqueia as atividades das DNA polimerases dependentes de RNA e DNA, inativando o sítio catalítico da enzima (DE CLERCQ, 2009). Efavirenz é específico para TR do HIV-1 e é um inibidor não competitivo no que diz respeito à matriz e trifosfatos básicos ou nucleosídeos. EFV não inibe a TR do HIV-2 e nem as DNA polimerases α , β , γ e δ de células eucarióticas (DE CLERCQ, 2004; DELLAMONICA, 2012).

2.2.4 Farmacocinética de EFV

O primeiro estudo farmacocinético de EFV foi realizado em ratos, macacos e um chimpanzé por Young et al. (1995). Após administração intravenosa (I.V) das doses de 1 e 2 mg/kg em dimetilsulfóxido (DMSO), respectivamente, em macacos e ratos, o clearance (Cl) foi de 11,6 e 68,2 mL/min/kg, o volume de distribuição (Vd) foi de 2,4 e 4,4 L/kg e a meia-vida ($T_{1/2}$) de 158 e 50 minutos, respectivamente, em macacos e ratos. O composto foi rapidamente eliminado em ratos, mas a eliminação foi consideravelmente mais lenta em macacos. O EFV é absorvido por via oral, apresentando valores de concentração plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) de 0,158 e 0,259 $\mu\text{g/mL}$ e o tempo para atingir $C_{m\acute{a}x}$ ($T_{m\acute{a}x}$) de 176 e 38 min em macacos e ratos após administração das doses de 2 e 10 mg/kg preparadas em 0,5% de metilcelulose, respectivamente. A biodisponibilidade absoluta foi de 42% em macacos e 16% em ratos (YOUNG et al., 1995).

Em 1998, Balani e colaboradores realizaram também o estudo farmacocinético do EFV em ratos e macacos. Em ratos, após administrações I.V de 2 e 5 mg/kg em DMSO, o valor médio de Cl, Vd e $T_{1/2}$ foram 67 ml/min/kg, 5,0 litros/kg e 1 hora, respectivamente. O fármaco foi metabolizado completamente, e os produtos foram excretados quase exclusivamente por via biliar. Na dose mais elevada de 15 mg/kg, o Cl foi reduzido em 36%, implicando saturação de processos de metabolismo. Um fenômeno similar ocorreu em macacos, em que o Cl diminuiu em 60%, com o aumento das doses I.V de 5 a 15 mg/kg. Após a administração oral, a biodisponibilidade de EFV em ratos (10 mg/kg) e macacos (2 mg/kg) foi 16% e 42%, respectivamente. As doses mais elevadas em ambas as espécies levaram a aumentos desproporcionais

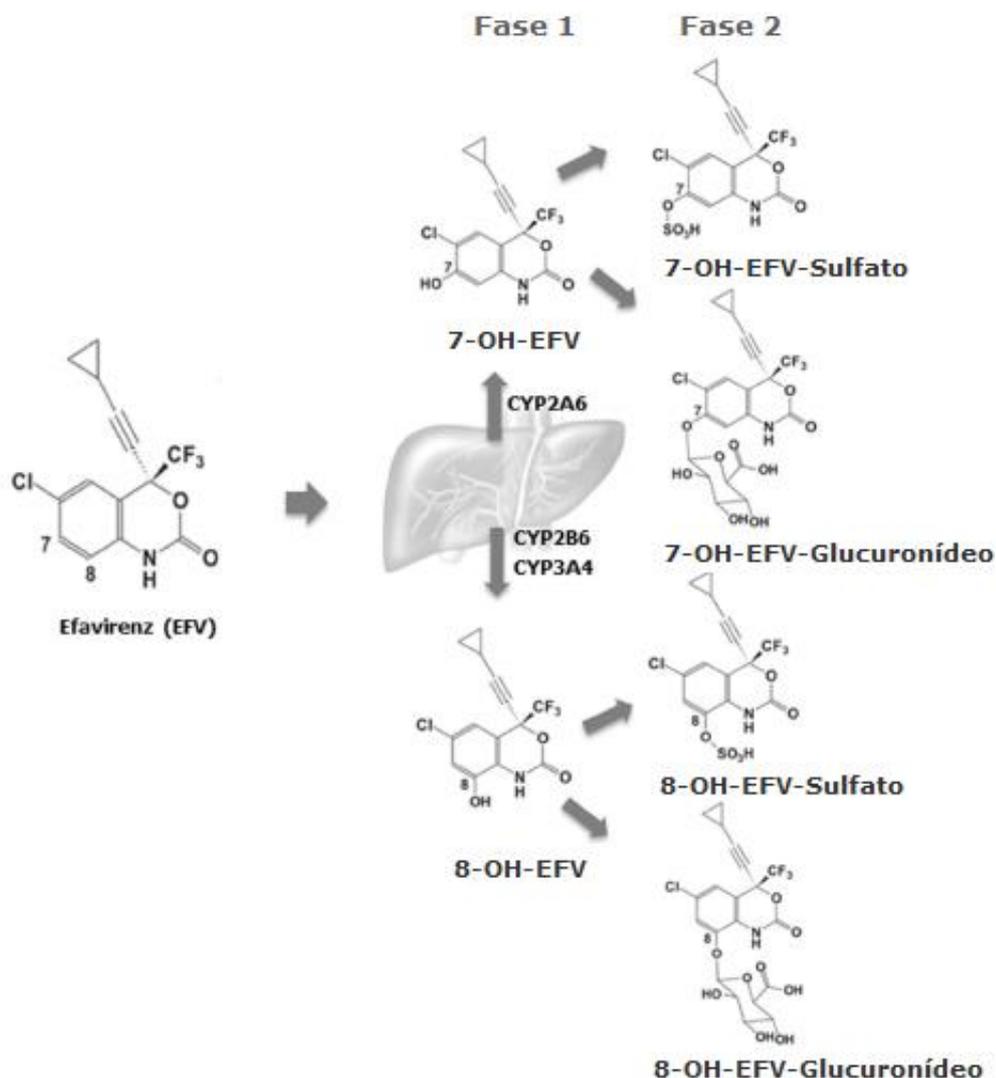
na área sob a curva (ASC) e valores de T_{máx} mais elevados, sugerindo saturação do metabolismo e/ou prolongamento da absorção. O atraso no T_{máx} foi mais pronunciado em macacos em que as concentrações plasmáticas atingiram platôs, mantidos durante 4 a 20 h. O atraso do esvaziamento gástrico foi observado em ratos e macacos quando os animais apresentaram vômitos nas doses de 160 mg/kg, sendo encontrado no estômago uma porção substancial da dose após 8 horas da administração. Com estes resultados, os autores relataram a ocorrência de farmacocinética não-linear de EFV em ratos e macacos devido ao esvaziamento gástrico retardado e a saturação dos processos dos metabólicos (BALANI et al., 1998).

Estudo em humanos realizado pela companhia Merck Sharp & Dohme Limited relata C_{máx} de 0,51 a 2,9 mg/L com T_{máx} de 5 horas após doses orais únicas de 100 a 1600 mg de EFV em voluntários saudáveis, sendo observado um aumento proporcional de C_{máx} e ASC. O período de tempo para se atingirem as concentrações plasmáticas máximas (3-5 horas) não se alterou após a administração múltipla e foram atingidas concentrações plasmáticas no estado estacionário entre 6 e 7 dias. No estado estacionário, C_{máx} média foi de $4,07 \pm 1,168$ µg/mL em 35 pacientes infectados pelo HIV que receberam 600 mg de EFV uma vez ao dia durante 6 a 10 dias. A concentração plasmática mínima (C_{mín}) em estado estacionário foi de $1,77 \pm 1,01$ µg/mL e ASC foi de $58,08 \pm 23,04$ µg.mL.h. EFV liga-se altamente às proteínas plasmáticas humanas, principalmente à albumina, aproximadamente 99,5 - 99,75 %. O Cl foi estimado em 4,3 L/h, após dose única de EFV por via oral em voluntários saudáveis, e aumentou para 11 L/h após a administração de doses múltiplas. Sua T_{1/2} é relativamente longa, de pelo menos 52 horas após doses únicas e em torno de 40 a 55 horas após doses múltiplas. A principal via de eliminação é através das fezes, tendo somente 1% de EFV excretado inalterado na urina. No estudo, também foi constatado que, em humanos, a infecção pelo HIV não altera os parâmetros farmacocinéticos do EFV.

Estudos em humanos e estudos *in vitro*, também realizados pela Merck Sharp & Dohme Limited, utilizaram microssomas hepáticos humanos e demonstraram que o EFV é metabolizado principalmente pelo sistema do citocromo P450 em metabólitos hidroxilados inativos contra o HIV-1. Os estudos *in vitro* indicam que CYP3A4 e

CYP2B6 são as principais isoenzimas responsáveis pelo metabolismo de EFV (**figura 2**), além de induzir seu próprio metabolismo por ser indutor de CYP3A4 e CYP2B6.

Figura 2 - Principais metabólitos do EFV obtidos no metabolismo hepático de fase 1 e 2.



Fonte: adaptado de APOSTOLOVA et al., 2017.

A hidroxilação do EFV por CYP2B6 tem sido considerada a principal rota metabólica, com a produção do metabólito hidroxilado na posição 8 (8-OH-EFV). Também podem ocorrer novas hidroxilações de 8-OH-EFV para formar os metabólitos 8,14-OH-EFV e 7, 8-OH-EFV. A hidroxilação mediada por CYP2A6 é considerada rota secundária do metabolismo do EFV, promovendo a formação do metabólito hidroxilado na posição 7 (7-OH-EFV). O EFV inalterado e seus metabólitos hidroxilados são conjugados para formar complexos glucuronados e sulfatados, cujas

concentrações no plasma são superiores quando comparadas às concentrações dos metabólitos hidroxilados não conjugados (APOSTOLOVA et al.,2017).

A isoformas 2B6 e 2A6 do CYP apresentam polimorfismo, o que também contribui – além das características de baixa solubilidade - para a alta variabilidade interindividual das concentrações plasmáticas do EFV na administração de doses padronizadas. Importante ressaltar que o EFV é indutor de 3A4 e 2B6, o que determina diferenças na capacidade metabólica na exposição repetida ao fármaco (GRILO et al., 2017).

O metabólito 8-OH-EFV tem sido considerado o principal agente responsável pela neurotoxicidade na administração de EFV, e este efeito é concentração dependente. Assim, é possível considerar que há maior expectativa de ocorrência de neurotoxicidade em indivíduos metabolizadores rápidos quando comparados aos metabolizadores lentos (GRILO et al., 2017).

A ação tóxica do metabólito do EFV tem sido relacionada a geração de radicais eletrofílicos, como iminoquinona e 7,8-EFV-quinona, que podem desfuncionalizar irreversivelmente proteínas cerebrais. Esses eletrófilos perdem a ação neurotóxica quando ocorre ligação com o grupo sulfidril (tiol) livre de cisteínas ou glutatona, funcionando como um mecanismo de proteção que bloqueia os resíduos eletrofílicos e previne reações irreversíveis proteínas cerebrais (GRILO et al., 2017).

2.3 Novas formulações de efavirenz

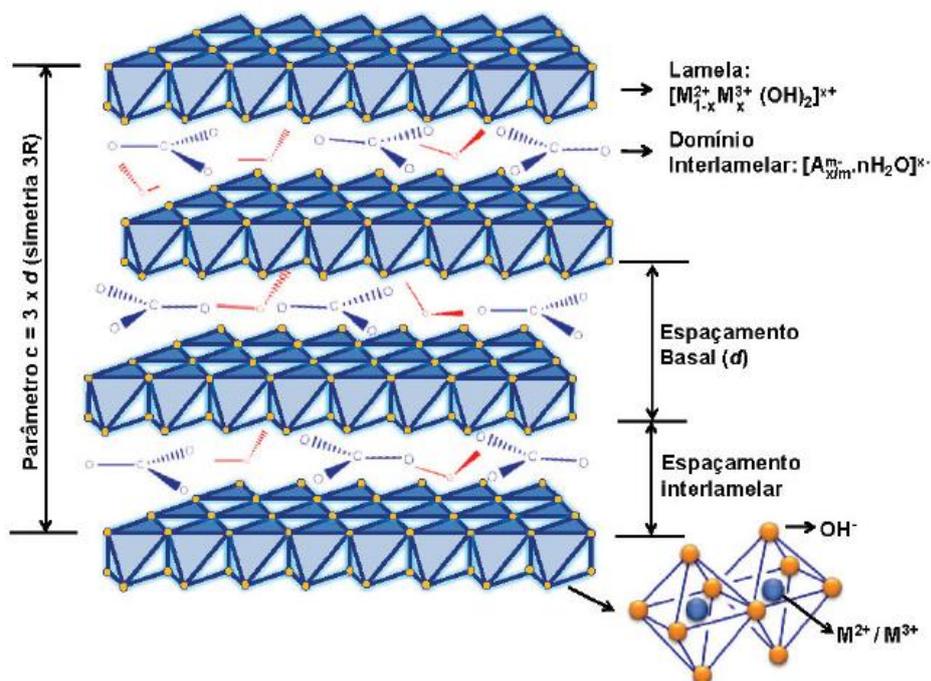
Diversos grupos de pesquisa têm desenvolvidos novas formulações com o objetivo de melhorar a solubilidade de EFV, já que este é o fator limitante de sua biodisponibilidade (CRISTOFOLETTI, 2013; GAUR et al., 2014), usando sistemas de liberação modificada de fármacos. Por exemplo, Gaur e colaboradores (2014) desenvolveram micropartículas lipídicas sólidas que aumentam a biodisponibilidade de EFV incorporado através da modificação da taxa de dissolução. Senapati e colaboradores (2017) elaboraram um sistema auto-emulsionável para liberação modificada de fármacos (SEDDS) baseado na mistura de surfactantes para incrementar a solubilidade de EFV. Quando esse sistema é introduzido no ambiente aquoso do trato gastrointestinal (TGI), imediatamente se emulsiona com auxílio da motilidade e forma uma nanoemulsão de óleo/água com tamanho menor que 200 nm.

Os resultados indicaram que a biodisponibilidade relativa de EFV incorporado no SEDDS foi otimizada em 263%.

2.3.1 Hidróxidos Duplos Lamelares

Uma alternativa promissora no desenvolvimento de sistemas de liberação é a utilização de hidróxidos duplos lamelares (HDL) junto com moléculas biologicamente ativas. O HDL é uma classe de argila aniônica, conhecido também como compostos do tipo hidrotalcita, que podem ser naturais ou sintetizadas em laboratório com facilidade e baixo custo (CREPALDI et al., 1998).

Figura 3 - Representação esquemática da estrutura dos HDL (se A^{n-} é o íon carbonato e M^{2+}/M^{3+} é Mg e Al (3:1), o HDL é a hidrotalcita).



Fonte: CUNHA et al, 2010.

Sua estrutura bidimensionalmente organizada e com poros flexíveis do HDL apresenta fórmula generalizada $[M^{2+}_{(1-x)}M^{3+}_x(OH)_2](A^{n-})_{x/n} \cdot zH_2O$ em que M^{2+} e M^{3+} são íons metálicos divalentes e trivalentes, respectivamente, e A^{n-} é o ânion interlamelar (BAO et al., 2016), conforme está representado na **figura 3**. Os dois íons metálicos ocupam o centro de octaedros que possuem ânions hidroxila em seus vértices e compartilham suas arestas, formando camadas planas e neutras mantidas juntas por

ligações de hidrogênio. O excesso de cargas positivas nas lamelas é compensado por ânions interlamelares e moléculas de água, proporcionando eletroneutralidade. O empilhamento das lamelas é mantido, não só pelas ligações de hidrogênio, mas também pela atração eletrostática entre as lamelas positivamente carregadas e os ânions interlamelares (CUNHA et al., 2010). Diversas interações como interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, troca iônica e outras podem ocorrer entre HDL e os fármacos, já que uma das propriedades do HDL é a sua capacidade de adsorção de moléculas independente de sua carga (TAKAHASHI e YAMAGUCHI, 1991).

Em geral, materiais inorgânicos apresentam propriedades promissoras como boa biodisponibilidade, baixa toxicidade, alta biocompatibilidade, capacidade de intercalação de espécies iônicas, possibilidade de funcionalização da superfície, aumento da estabilidade das espécies inseridas e promoção de liberação sustentada (CUNHA et al., 2010).

O HDL já é empregado comercialmente para uso terapêutico, sendo encontrado com o nome Talcid®, um antiácido patenteado pela empresa Bayer AG. Além de ser usado como o princípio ativo, também pode ser aplicado como excipiente farmacêutico para intercalar biomoléculas carregadas negativamente (CUNHA et al., 2010). Fármacos, proteínas e genes intercalados com HDL são chamados híbridos orgânicos-inorgânicos, que têm se destacado como excelentes carreadores por conferir incremento das propriedades de dissolução (PERIOLI et al., 2011; FONTES, 2016), estabilidade térmica (GAO et al., 2014), controle da taxa de liberação de fármacos (ALI et al., 2012; YADOLLAHI, 2015; XU, 2016; ANDREA, 2017; RAY, 2017), e apresentar biocompatibilidade e baixa citotoxicidade (CHOY, 2000; BAO, 2016). Ainda, o HDL tem sido amplamente aplicados na área ambiental e biomédica como catalisador (CASTRO, 2016), material eletroativo (PRASAD, 2010), agente adsorvente (AHMED, 2017), biosensor (QIAO, 2015) entre outras aplicações.

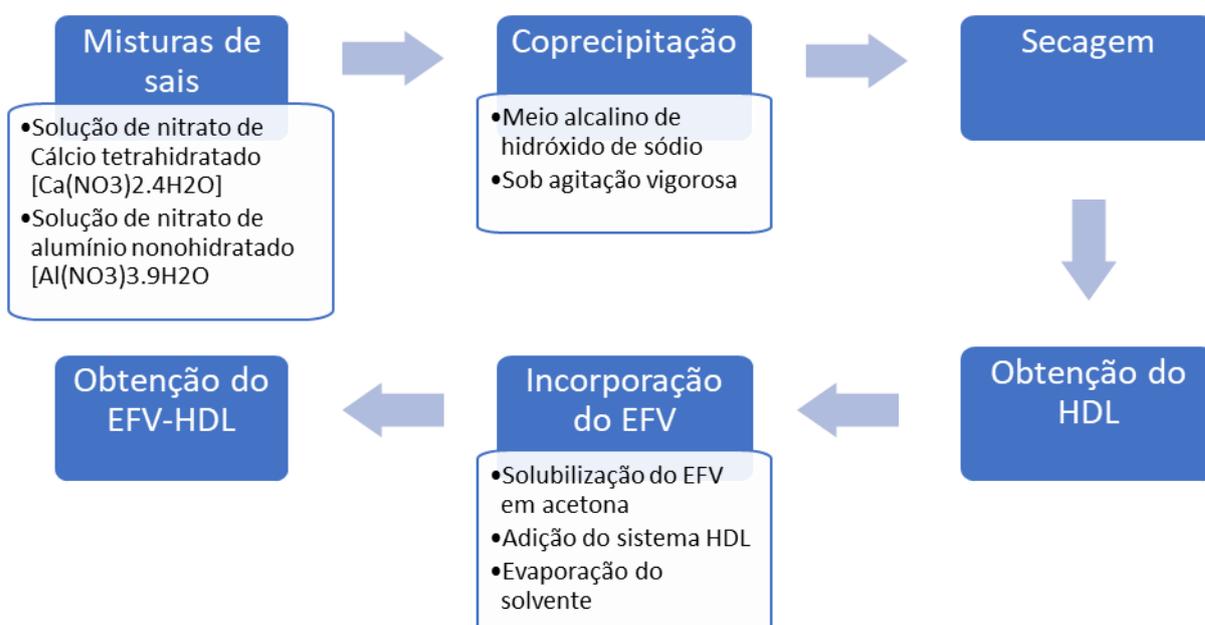
O mecanismo de liberação da substância intercalada pode ocorrer pela solubilização das lamelas do HDL promovida pela redução do pH e/ou pela reação de troca aniônica com espécies existentes no organismo. No caso de administração oral, a liberação da substância pode ocorrer pela dissolução do material híbrido no suco gástrico do estômago ou pela reação de troca iônica no intestino delgado, contanto que o material seja recoberto com um revestimento protetor entérico adequado. No uso tópico, pode ser liberada por troca iônica com espécies do fluido da transpiração

(NaCl, por exemplo). Na administração intravenosa, a partícula do híbrido pode ser levada para o interior da célula por endocitose, onde a liberação da substância acontece por dissolução parcial ou a troca aniônica no HDL em razão da presença de íons H^+ e Cl^- . Os endossomas podem se fundir com os lisossomos, promovendo uma dissolução lenta em função do pH do meio de aproximadamente 4-5. Também, o HDL intacto pode escapar do endossoma, permanecer no citoplasma e reagir com espécies aniônicas presentes no citosol (pH aproximadamente 7,4) (CUNHA et al., 2010).

2.3.2 Sistema EFV-HDL

Tendo em vista a aplicação de HDL como um excipiente funcional na área farmacêutica, Fontes e colaboradores (2016) desenvolveram um sistema para incorporação de EFV ao HDL, capaz de incrementar a solubilidade deste fármaco. O processo de obtenção do sistema de EFV-HDL se inicia pela síntese do HDL através da coprecipitação de soluções dos sais de nitrato de cálcio e nitrato de alumínio em meio alcalino sob agitação vigorosa. Posteriormente, o sistema segue para as etapas de secagem, caracterização e incorporação do fármaco em diferentes proporções (10, 20, 30, 50, 60 e 70 %) (FONTES et al., 2016), conforme descrito na **figura 4**.

Figura 4 - Processo de obtenção do sistema EFV-HDL.

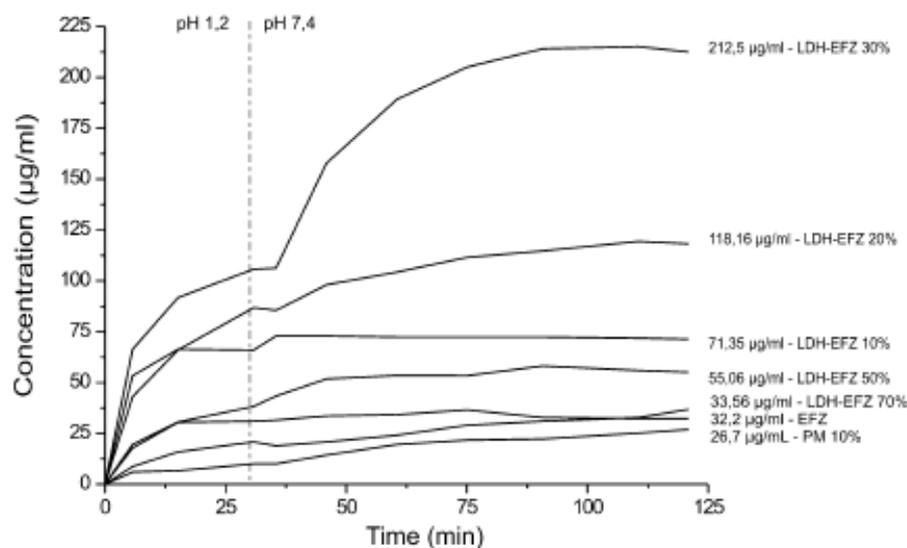


Fonte: do autor (2018).

A caracterização dos sistemas foi realizada através de técnicas analíticas como difração de raio-X, espectroscopia de infravermelho, análise térmica por calorimetria diferencial exploratória. Além disso, foram realizados testes de dissolução *in vitro* e atividade anti-proliferativa em linhagens de células de macrófagos humanos.

Na **figura 5** estão apresentados os sistemas obtidos com diferentes proporções de fármaco; dentre eles, o sistema 30% EFV-HDL obteve maior destaque por proporcionar um aumento da solubilidade de cerca de 558% do EFV quando comparado ao fármaco sozinho. Esse incremento da solubilidade é decorrente do fenômeno de amorfização, que implica na perda do estado cristalino do composto, tornando-se amorfo. Isto aumenta a capacidade de solubilização em meio aquoso, sendo um fato muito importante para melhorar absorção do EFV. O fenômeno é confirmado pela ausência do ponto de fusão do fármaco, que indica que o estado cristalino das partículas EFV desapareceram, resultando em um composto amorfo; e pode ser observado nos sistemas contendo até 30% de EFV (FONTES et al., 2016).

Figura 5 - Perfis de dissolução do EFV e dos sistemas EFV-HDL com diferentes proporções.



Fonte: FONTES et al., 2016.

2.4 Farmacocinética

2.4.1 Processos e parâmetros farmacocinéticos

Ainda que as propriedades farmacodinâmicas sejam atributos fundamentais no desenvolvimento de novos medicamentos, é necessário que as propriedades farmacocinéticas sejam conhecidas para se obter resultados válidos em ensaios pré-clínicos e clínicos (FAN et al., 2014).

A farmacocinética (PK) é a ciência que descreve o movimento dos fármacos no corpo após administração e é compreendida através do estudo dos processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME). Enquanto, a farmacodinâmica (PD) é o estudo dos efeitos bioquímicos e fisiológicos dos fármacos no organismo; incluindo os mecanismos de ação e a relação entre concentração e efeito (JANG et al., 2001; FAN et al., 2014).

Absorção é o processo pelo qual as moléculas do fármaco inalterado se deslocam do local de administração para a circulação sistêmica. A administração oral é considerada a via mais importante devido seu frequente uso, facilidade e segurança. A absorção do trato gastrointestinal (TGI) para circulação sistêmica envolve um processo complexo e requer que o fármaco seja capaz de permear as membranas do TGI e alcance o sangue sem que seja metabolizado durante a passagem pelo sistema porta-hepático (eliminação pré-sistêmica) (STORPIRTIS et al., 2011).

O processo de absorção depende de propriedades físico-químicas do fármaco, como solubilidade, lipofilicidade, tamanho molecular e carga. Antes de serem absorvidos, os compostos forem veiculados por formas farmacêuticas sólidas, estas devem ser desintegradas para expor os compostos ao meio biológico e submetê-los aos fluidos capazes de convertê-los em partículas menores, permitindo a dissolução no TGI e disponibilizando as moléculas para absorção (FAN et al., 2014). Pequenos compostos lipofílicos geralmente são absorvidos por meio de difusão passiva a favor do gradiente de concentração. Compostos grandes, altamente polares ou carregados dependem da presença de transportadores ativos de influxo, por terem sua capacidade de partição nas bicamadas lipídicas da membrana limitada (AZEREDO et al., 2009; STORPIRTIS et al., 2011; FAN et al., 2014). A velocidade e a eficiência da absorção são influenciadas pela via de administração e da forma farmacêutica, bem

como por fatores como pH do TGI, pKa do fármaco, motilidade intestinal, tempo de esvaziamento gástrico, presença de alimentos, eliminação pré-sistêmica (hepática, microbiota intestinal, enzimas metabólicas intestinais como citocromo P450 e glicoproteína-P) (BOROUJERDI, 1995). Em geral, a velocidade de absorção é mais elevada para fármacos em solução, seguido por fármacos contidos em cápsulas e, por fim, fármacos contidos em comprimidos (BROCKS, 2010; STORPIRTIS et al., 2011).

A absorção é caracterizada pelos parâmetros farmacocinéticos: concentração máxima ($C_{máx}$); tempo de ocorrência da $C_{máx}$ ($t_{máx}$); biodisponibilidade oral (Foral), que reflete a proporção de fármaco que é absorvido e disponibilizado para circulação sistêmica, sendo calculada a partir da área sob a curva (ASC); constante de absorção (K_a), que caracteriza a velocidade com que ocorre o processo de absorção; meia vida de absorção ($T_{1/2a}$), que reflete o desaparecimento do fármaco do local da administração; tempo de absorção médio (MAT), que indica o tempo médio que uma molécula gasta no sítio de entrada antes de ser absorvido; e tempo para o início da absorção, conhecido no inglês como “lag time” (T_{lag}) (CUTLER, 1978; TOUTAIN e BOUSQUET-MELOU, 2004d; BENEDETTI et al., 2009; STORPIRTIS et al., 2011).

Distribuição é o processo de transferência reversível do fármaco dos líquidos de circulação para os diversos tecidos e órgãos. A concentração plasmática de um fármaco é relacionada ao quanto ele é distribuído para sítios extra vasculares. Isto é influenciado pelas características físico-químicas do fármaco, bem como pelo fluxo sanguíneo nos órgãos e tecidos, extensão da ligação a proteínas plasmáticas, diferenças de pH nos vários tecidos e coeficiente de partição óleo-água do fármaco ($\log P$). Essas características definirão a afinidade do fármaco em se distribuir para determinado tecido ou órgão (FAN et al., 2014, RANG E DALE, 2016).

O parâmetro farmacocinético que descreve a distribuição é o volume de distribuição (V_d), que representa o volume aparente necessário para conter todo fármaco do organismo na concentração observada no plasma. Diversos tipos de V_d podem ser calculados: volume de distribuição no compartimento central (V_c) ou volume de distribuição inicial (V_i), que representa a distribuição inicial de um fármaco no sangue e em tecidos com alta perfusão sanguínea; volume de distribuição calculado pelo método de área sob a curva ($V_{d\text{área}}$), que estima a distribuição de fármacos em tecidos por todo corpo em pseudo-equilíbrio; e o volume de distribuição

no estado estacionário (V_{ss}), representa a distribuição do fármaco no estado de equilíbrio entre as fases farmacocinéticas, pois contempla a taxa de entrada e de saída do fármaco dos tecidos. Para os fármacos cuja distribuição ocorre imediatamente, situação característica ao modelo monocompartimental, os três volumes de distribuição terão valores similares. Já os fármacos que se distribuem para mais de um compartimento, geralmente seguem a ordem $V_{d\text{área}} > V_{ss} > V_c$ (TOUTAIN e BOUSQUET-MELOU, 2004c).

A eliminação é processo de remoção irreversível de um fármaco ou de seus metabolitos do organismo, regido predominantemente pelos processos de metabolismo e excreção. Metabolismo ou biotransformação é o processo de conversão do fármaco em metabólitos mais solúveis para excreção biliar ou renal. O principal órgão metabolizador é o fígado, contudo o metabolismo também pode ocorrer nos pulmões, rins, TGI e até mesmo no sangue. As reações metabólicas são catalisadas por sistemas enzimáticos, responsáveis pelos processos bioquímicos classificados como reações de fase I e fase II. As reações de fase I envolvem a transformação da estrutura molecular pela introdução ou modificação de um grupo funcional, através de reações de oxidação, redução, carboxilação ou hidrólise, catalisadas pelas enzimas do citocromo P450. As reações de fase II são responsáveis pela conjugação dos metabólitos de resultantes da fase I com ácido glucurônico, sulfato, ou aminoácidos através de enzimas conhecidas como transferases (BOROUJERDI, 1995; FAN et al., 2014). Por outro lado, a excreção representa a eliminação do fármaco inalterado. As principais rotas de excreção são pela via renal e biliar, mas também pode ocorrer pela saliva, leite e ar exalado (BOROUJERDI, 1995, TOZER et al., 2009). A excreção renal geralmente envolve um ou mais dos três processos distintos: filtração glomerular, secreção e reabsorção tubular renal. A excreção biliar é um processo facilitado pelo sistema de transporte ativo localizados na membrana canalicular do hepatócito, sendo um importante caminho de eliminação hepática para muitos compostos.

Um dos parâmetros farmacocinéticos relacionado à eliminação é o clearance (Cl), que reflete a capacidade do organismo em eliminar o fármaco ou de um único órgão em eliminar o fármaco (por exemplo, $Cl_{\text{hepático}}$ e Cl_{renal}) e é definido como volume de plasma do qual o fármaco é eliminado por unidade de tempo (BOROUJERDI, 1995; TOUTAIN E BOUSQUET-MÉLOU, 2004; FAN et al., 2014). A somatória do Cl de todos

os órgãos eliminadores corresponde ao clearance total (Cl_T), representado pela **equação 1**:

(Eq. 1)

$$Cl_T = Cl_{\text{hepático}} + Cl_{\text{renal}} + \dots$$

O CI pode ser alterado em indivíduos com insuficiência hepática e/ou renal, promovendo mudanças significativas também no parâmetro meia-vida de eliminação ($T_{1/2}$). Desta forma, para fármacos com estreita margem terapêutica, é necessário que haja ajuste de dose e, em casos de fármacos nefrotóxicos ou hepatotóxicos, o monitoramento de marcadores renais e hepáticos (TOUTAIN e BOUSQUETMÉLOU, 2004a).

A $T_{1/2}$ é o tempo necessário para que a concentração plasmática decline para a metade. É considerado um parâmetro híbrido, pois depende do CI e Vd. Quando o processo de absorção é um fator limitante, a $T_{1/2}$ reflete a taxa e extensão da absorção e não o processo de eliminação (farmacocinética flip-flop). A velocidade com que ocorrem os processos de eliminação do fármaco (biotransformação e excreção) é caracterizada pela constante de eliminação (K_{el}).

Os parâmetros de tempo médio permitem observar quanto tempo o fármaco permanece inalterado no organismo. Estes parâmetros (tempo de trânsito médio – MTT e tempo de residência médio - MRT) permitem elucidar o tempo médio de movimento das moléculas de fármaco (na forma inalterada) no organismo desde o início da sua introdução, incluindo a absorção (MTT) ou após a absorção praticamente terminada (MRT). No caso de administração intravenosa ou intrarterial, o MRT é igual ao MTT.

2.4.2 Modelos farmacocinéticos

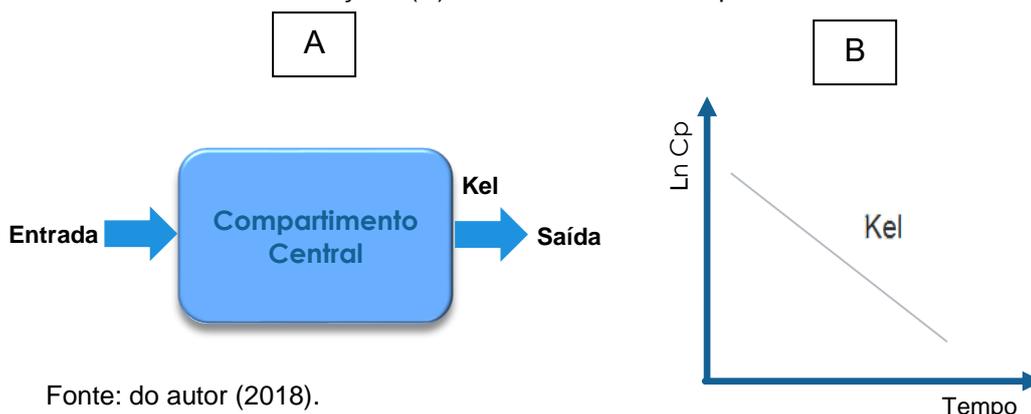
O estudo dos processos e parâmetros farmacocinéticos é baseado na curva de concentração plasmática do fármaco *versus* tempo. A partir da análise da curva, modelos matemáticos são aplicados para explicar e prever o comportamento do fármaco no organismo. Essa correlação matemática é conhecida como modelos farmacocinéticos, descritos na literatura como modelos compartimentais ou não

compartimentais, sendo o primeiro o mais aplicado para calcular os parâmetros farmacocinéticos (BOROUJERDI, 1995; STORPIRTIS et al., 2011; FAN et al., 2014).

No modelo compartimental, o organismo é constituído por compartimentos que o representam no ponto de vista cinético, mas não possuem significado anatômico ou fisiológico. O modelo tem como premissa a homogeneidade de distribuição e equilíbrio instantâneo das concentrações dentro do compartimento. Podem ser classificados como modelos: monocompartimental (compartimento único) ou multicompartimentais (dois ou mais compartimentos). A escolha do modelo compartimental que melhor se ajusta à disposição cinética do fármaco é feita através da transformação dos valores de concentração plasmática em logaritmo natural (“ln”) e sua plotagem *versus* tempo (STORPIRTIS et al., 2011).

O modelo de compartimento único ou monocompartimental é o mais simples e assume que o fármaco é distribuído de forma instantânea e homogênea pelo por todos os líquidos e tecidos do organismo. Desta forma, o único processo que rege o decaimento das concentrações é a eliminação, existindo apenas uma velocidade de decaimento que caracteriza a constante de eliminação, denominada (K_{el}). Entretanto, esse padrão homogêneo de distribuição não significa que sua concentração é a mesma em todos os tecidos, mas sim, que as diferentes concentrações estão em equilíbrio (STORPIRTIS et al., 2011; FAN et al., 2014). Esquemáticamente, o modelo é caracterizado pelos processos de entrada, distribuição e saída (eliminação), como está representado na **figura 6.A** e tem seu perfil de “ln” da concentração do fármaco *versus* tempo apresentado por uma única reta de decaimento das concentrações, podendo inferir que disposição cinética é monocompartimental (DHILLON et al., 2006).

Figura 6 - Representação esquemática (A) e representação gráfica do decaimento das concentrações (B) no modelo monocompartimental.

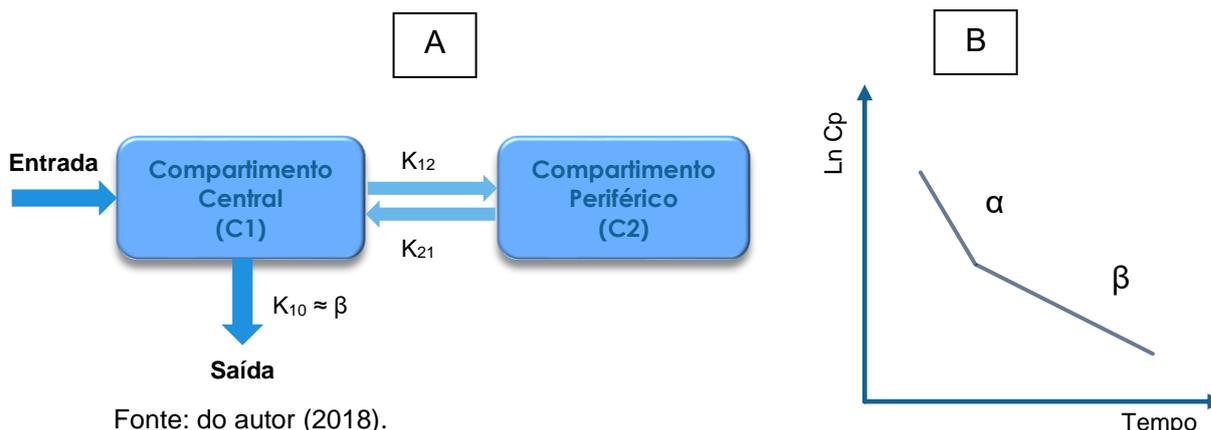


Fonte: do autor (2018).

Os modelos multicompartimentais são os mais adequados para interpretar o comportamento de muitos fármacos no organismo. Semelhantemente ao modelo monocompartimental, os modelos de vários compartimentos são avaliados pelos valores de “ln” da concentração plasmática *versus* tempo, sendo o número de retas apresentadas na fase de eliminação correspondente ao número de compartimentos. O modelo mais empregado é o bicompartimental (dois compartimentos), seguido dos modelos tricompartmentais (três compartimentos), que já se tornam muito complexos (BOROUJERDI, 1995; STORPIRTIS et al., 2011; FAN et al., 2014).

O modelo de bicompartimental considera o organismo em um compartimento central e um compartimento periférico. Os compartimentos são conjuntos de tecidos diferentes que possuem graus de afinidade diferentes dependendo das características do fármaco e da perfusão de sangue do órgão. Embora esses compartimentos não sejam um conjunto fixo de tecidos e não possuam significado fisiológico ou anatômico, é assumido que o compartimento central compreende tecidos altamente perfundidos como coração, pulmões, rins, fígado e cérebro. O compartimento periférico compreende tecidos com perfusão sanguínea menor, como músculo, gordura e pele (DHILLON et al, 2006; STORPIRTIS et al., 2011). A distribuição do fármaco é mais rápida no compartimento central quando comparada ao periférico, desta forma existem duas velocidades de decaimento das concentrações que caracterizam constantes de eliminação diferentes: constante de distribuição α (composta pelas microconstantes K_{12} e K_{21}), representa a fase de distribuição, e constante de eliminação β , representa a fase de eliminação do fármaco. Esquemáticamente, o modelo é caracterizado pelos processos de entrada, distribuição central, distribuição periférica e saída (eliminação), como está representado na **figura 7.B** e tem seu perfil de “ln” da concentração do fármaco *versus* tempo apresentado por duas retas de decaimento das concentrações, podendo inferir que disposição cinética é bicompartimental (DHILLON et al., 2006).

Figura 7 - Representação esquemática (A) e representação gráfica do decaimento das concentrações (B) no modelo bicompartmental.



Fonte: do autor (2018).

2.4.3 Ordem cinética

Os processos fisiológicos ADME seguem uma cinética de transferência do fármaco através do organismo, que é caracterizada por meio de constantes de velocidade relacionadas a uma determinada ordem cinética (primeira ordem ou ordem zero). A ordem cinética é definida como o modo pelo qual a concentração do fármaco se relaciona com a velocidade envolvida no processo de transferência do fármaco através do sistema biológico.

A cinética de primeira ordem ou cinética linear ocorre quando a velocidade dos processos é diretamente proporcional as concentrações plasmáticas e os processos não são saturáveis. Nestes casos, a ASC é diretamente proporcional à dose administrada, e a alteração de dose não implica em modificações nos valores de meia-vida de eliminação, Cl ou Vd. Em geral, os processos ADME seguem a cinética de primeira ordem nas doses empregadas usualmente na terapêutica. (DHILLON et al, 2006; STORPIRTIS et al., 2011).

A cinética de ordem zero é descrita como cinética dose dependente ou não linear e ocorre quando a velocidade do processo é constante, independente da concentração do fármaco. Diversos fatores podem promover a cinética não linear, como baixa solubilidade do fármaco, alterações no esvaziamento gástrico bem como a saturação de processos enzimáticos (cinética de Michaelis-Menten) envolvidos nos processos ADME. Nos casos de cinética de saturação, a meia-vida de eliminação, por exemplo, tende a ser maior quando a dose administrada é maior (BOROUJERDI, 1995; DHILLON et al, 2006; STORPIRTIS et al., 2011).

2.3.4 Farmacocinética pré-clínica no desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos

O desenvolvimento de novos medicamentos é um processo extenso que pode envolver inovação radical, que consiste na descoberta de uma nova molécula, ou inovação incremental, que busca o aprimoramento de características físico-químicas, farmacodinâmicas ou farmacocinéticas em formulações já existentes no mercado. A vantagem da inovação incremental é o menor tempo de desenvolvimento e a maior probabilidade de sucesso, pelo fato de se trabalhar com moléculas que já tiveram estudos concluídos das etapas pré-clínicas e clínicas. No entanto, o produto em desenvolvimento necessita de estudos elaborados que podem levar anos até que se encontre resultados viáveis para os ensaios clínicos (KHANNA, 2012; PETROVA, 2014).

A farmacocinética pré-clínica é um processo importante na decisão de prosseguimento do desenvolvimento de novo fármaco ou formulação para os estudos clínicos. Um perfil farmacocinético favorável aumenta a probabilidade de o produto ser mais eficaz e seguro. Desta maneira, a avaliação farmacocinética pré-clínica deve ser abrangente o suficiente para auxiliar na escolha do produto mais adequado e, assim, garantir que não ocorram falhas na cadeia de desenvolvimento (SINGH, 2006; SHANG et al, 2012).

2.5 Modelo animal

O desenvolvimento de medicamentos envolve a utilização de modelos experimentais *in vivo*. Apesar da redução drástica do uso de animais, os estudos *in vivo* ainda são cruciais para fornecer informações para o prosseguimento dos estudos clínicos, pois permite predizer aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos do produto no organismo (SINGH, 2006; SHANG et al, 2012).

Entretanto, existem muitas diferenças entre espécies animais e entre animais e humanos. Diferenças anatômicas e fisiológicas são os fatores principais que causam discrepância entre animais e o homem em relação a disposição cinética do composto em estudo. Em razão disso, é muito importante conhecer o modelo animal selecionado (ZWART et al.; 1999).

As espécies de animais geralmente usadas nos estudos de farmacocinética são camundongos, ratos, coelhos, cachorros e macacos. O modelo animal selecionado foi o coelho, devido a facilidade de administração de forma farmacêutica sólida, baixo custo em relação a animais maiores e pela disponibilidade de biotério com instalação apropriada para o modelo escolhido.

O coelho de laboratório (*Oryctolagus cuniculus*) durante muito tempo pertenceu a ordem Rodentia, porém, atualmente pertence à ordem Lagomorpha, por causa da diferença anatômica de sua dentição. Dentre as raças mais utilizadas para fins laboratoriais, está a raça Nova Zelândia, de reconhecida docilidade, fácil reprodução e manejo, e com uniformidade de reações nas provas experimentais. Apesar de serem dóceis, são susceptíveis ao estresse e assustam-se facilmente (ANDRADE et al., 2012).

Os coelhos são herbívoros e também podem ser alimentados com ração peletizada formulada especialmente para coelhos. Água fresca deve ser fornecida diariamente e *ad libitum*. A reingestão de fezes (coprofagia) é uma prática frequente entre coelhos e é importante para manter uma alimentação adequada e fisiologia intestinal normal. O consumo diário de ração para coelhos adultos da raça Nova Zelândia é em média de 100 g a 200 g, devendo ser oferecida uma vez ao dia, a fim de evitar a engorda excessiva dos animais. Os animais devem ser alojados em gaiolas individuais sob condições controladas. O animal deve ser transportado, segurando com uma das mãos a pele do pescoço e com a outra as patas traseiras, mantendo-o junto ao corpo. O manejo e contenção deve ser feito de forma segura, com o objetivo de reduzir a irritabilidade do animal, facilitar os procedimentos experimentais e proteger o pesquisador (CCAC, 1984; ANDRADE et al., 2012).

As características gerais do coelho são corpo longilíneo com peso corporal entre 2 a 4 kg, cabeça grande provida de largas orelhas, com audição e olfato bem desenvolvidos e amplo campo de visão. A temperatura média do corpo é 38,3°C, podendo flutuar consideravelmente com a excitação causada pelo manuseio ou mesmo quando outros sinais de perturbação não são óbvios. A urina de coelho é normalmente alcalina, espessa, turva e contém material cristalino (CCAC, 1984; ANDRADE et al., 2012).

Diferenças e semelhanças em características anatômicas e fisiológicas entre coelhos e humanos foram reportadas por De Zwart e colaboradores (1999).

Começando pela boca, onde se inicia a digestão e absorção, a estrutura, composição e fisiologia da cavidade e mucosa oral mostraram-se semelhantes ao dos humanos. O coelho é monogástrico, ou seja, não ruminante e sem regiões especializadas, apresentando uma morfologia simples com pequena capacidade de armazenamento. Ao contrário dos humanos, os coelhos são “comedores contínuos” e nunca estão com o estômago vazio. O esvaziamento gástrico nos coelhos é lento e variável comparado ao dos humanos, influenciando significativamente a entrada dos fármacos no intestino. O pH estomacal é baixo ($\text{pH} \pm 1,9$) e, por isso, a microbiota do estômago é pequena e semelhante ao dos humanos. O intestino delgado com cerca de 2 a 3,5 m, pode ser dividido em duodeno, jejuno e íleo. O intestino grosso inicia-se pelo ceco, órgão muito desenvolvido que representa cerca de 40% do tubo digestivo, responsável por uma considerável fermentação bacteriana e síntese de vitaminas. O intestino grosso continua pelo cólon, que pode ser dividido anatomicamente em quatro partes, terminando no reto do ânus. O pH intestinal é próximo ao neutro, tendendo ao alcalino no estado alimentado. A motilidade intestinal é similar ao dos humanos (KARARLI, 1995; DE ZWART et al., 1999).

A vesícula biliar dos coelhos é localizada na mesma região que a dos humanos. Contudo, o fluxo biliar (130 mL/d/kg) é muito maior comparado com os humanos (2,2 – 22,2 mL/d/kg) e outras espécies. A importância do fluido biliar na absorção é reconhecida, pois melhoram a taxa de dissolução e solubilidade de compostos lipossolúveis. Ainda, pode ser a principal rota de excreção de fármacos com peso molecular maior que 400. A circulação de sais biliares é restrita a circulação entero-hepática, portanto fármacos excretados pela bile podem ser reabsorvidos, através da hidrólise de glucuronídeos conjugados ao fármaco pela microbiota intestinal (KARARLI, 1995).

O processo de metabolismo também apresenta diferenças interespecies. Em geral, pequenos animais tendem a eliminar os fármacos mais rapidamente do que os seres humanos quando comparado com uma base de peso-normalizado. Os citocromos P450 (CYP) pertencem a uma família de enzimas reconhecida pelo seu importante papel no metabolismo, principalmente nas reações de fase I. Apesar dos membros desta superfamília possuírem cadeias de aminoácidos altamente conservadas, pequenas diferenças podem originar modificações na especificidade do substrato e na atividade catalítica. Assim, as diferenças nas isoformas do CYP entre

as espécies são a principal causa de diferenças do metabolismo de um fármaco (MARTIGNONI et al., 2006).

A isoforma mais importante envolvida no metabolismo de xenobióticos de todas as espécies é CYP3A (MARTIGNONI et al., 2006). No entanto, a isoforma CYP2C parece ser a mais importante nos coelhos, assumindo o papel das CYP3A nos humanos. A CYP1A2 e CYP2E1 é homóloga ao dos humanos e o ortólogo humano CYP2B6 não é amplamente expressado nos coelhos. A isoforma humana CYP2D6 também não tem uma CYP análoga nos coelhos. Curiosamente, uma enzima CYP2E2 é expressa em muitos animais jovens, tendo estrutura e especificidade do substrato quase idênticas. Portanto, o metabolismo de um terço dos medicamentos utilizados em humanos envolve outras isoformas da CYP. (ZUBER et al., 2002).

Ressalte-se que, para o EFV administrado no homem, a isoforma CYP2B6 apresenta o mais importante papel no metabolismo. Em humanos, a família CYP2B inclui CYP2B6 e CYP2B7, e estima-se o conteúdo de CYP2B6 no tecido hepático humano é de 2 a 10% (MARTIGNONI et al., 2006); por outro lado, em coelhos, a subfamília 2B é representada principalmente pelas isoformas 2B4, 2B5.

Devido às diferenças dependentes da espécie na sequência de aminoácidos das diferentes isoformas do CYP, há expectativas de diferenças na efetividade da ação sobre substratos específicos, o que determinaria capacidade metabólica significativamente diferente entre estas espécies. No caso do EFV, esta diferença sobre a subfamília B do citocromo P450 pode levar a diferenças significantes sobre o perfil cinético porém, é importante ressaltar que a seleção do modelo experimental (o coelho) não reside somente na semelhança deste com o modelo alvo (neste caso o homem), mas também no conhecimento pleno de suas características de semelhanças e diferenças, que auxiliarão na interpretação dos resultados provenientes do modelo experimental para posterior transposição de hipóteses para o modelo alvo.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

- Analisar o perfil farmacocinético de EFV veiculado em HDL com ou sem associação à lamivudina e tenofovir.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método bioanalítico para quantificar EFV em plasma de coelhos por UPLC;
- Avaliar o perfil farmacocinético do insumo farmacêutico ativo (IFA) EFV após administração intravenosa na dose de 2,7 mg/kg em coelhos neozelandeses (machos, n=7);
- Avaliar o perfil farmacocinético do EFV-IFA administrado em dose única de 50 mg por via oral em coelhos neozelandeses (machos, n=7);
- Avaliar o perfil farmacocinético do EFV-HDL administrado em dose única de 50 mg por via oral em coelhos neozelandeses (machos, n=7);
- Avaliar o perfil farmacocinético do EFV-IFA em associação a lamivudina e tenofovir administrado em dose única (50 mg, 25 mg e 25 mg, respectivamente) por via oral em coelhos neozelandeses (machos, n=7);
- Avaliar o perfil farmacocinético do EFV-HDL em associação a lamivudina e tenofovir administrado em dose única (50 mg, 25 mg e 25 mg, respectivamente) por via oral em coelhos neozelandeses (machos, n=7);
- Calcular a biodisponibilidade oral do EFV-IFA e para EFV-HDL utilizando como referência a administração intravenosa;
- Comparar os parâmetros farmacocinéticos entre os grupos através de análise estatística.

4 Material e Métodos

4.1 Matéria-prima, reagentes e solventes

- Acetonitrila (J. T. Backer), EUA;
- diazepam (insumo farmacêutico ativo concedido pela UNESP), Brasil;
- Dimetilsufóxido (Synth), Brasil;
- efavirenz (insumo farmacêutico ativo concedido pela UFPE-LTM), Brasil;
- Etanol (J. T. Backer), EUA;
- Heparina sódica (Blausiegel), Brasil;
- lamivudina (insumo farmacêutico ativo concedido pela LAFEPE), Brasil;
- Metanol, J. T. Backer, EUA;
- Sistema microparticulado HDL (Ca-Al) – EFV, UFPE-LTM, Brasil;
- tenofovir (insumo farmacêutico ativo concedido pela FUNED), Brasil;
- Trietilamina (Sigma-Aldrich), Bélgica.

4.2 Equipamentos

- UPLC Acquity®, Waters;
- Agitador magnético com aquecimento, Ethiktechnology;
- Banho ultrassônico, Ultrasonic Cleaner 2840DA, odontobrás;
- Vórtex AP56, Phoenix;
- Centrífuga Sorval Biofuge, Thermo scientific;
- MiniVac Sample Concentrator, GeneVac;
- Mini-centrífuga, Gilson;
- Banho-maria 1147, Fanem;

4.3 Correlatos

- CSH C18, 1,7 μ m, 2,1x100mm;
- Pré-coluna CSH C18, 1,7 μ m, 2,1x 5mm;
- Filtro de seringa PTFE, diâmetro 13mm, poro 22 μ m, Analítica.

4.4 Softwares

- Empower 3, Waters®
- Graphpad Prism® versão 5.0
- Origin® versão 7

4.5 Desenvolvimento do método bioanalítico

O desenvolvimento do método bioanalítico foi realizado em conjunto com o mestrando Jonata Augusto de Oliveira, que desenvolveu o trabalho intitulado “Farmacocinética do efavirenz em coelhos: estudo comparativo de formas farmacêuticas sólidas” nesta mesma instituição sob orientação da Prof. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini.

4.5.1 Sistema Cromatográfico

A análise do EFV em plasma foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) Acquity® Waters equipado com detector UV-VIS operando a 245 nm. A separação dos analitos foi feita em coluna CSH C18, 1,7 µm, 2,1x100 mm com pré-coluna CSH C18, 1,7 µm, 2,1x5 mm. A fase móvel foi constituída de metanol, acetonitrila e trietilamina 0,1%, pH 4 (20:50:30) com fluxo constante de 0,30 mL/min em modo isocrático e volume de injeção de 2 µL.

4.5.2 Preparo da amostra

O preparo da amostra de plasma para a extração do EFV iniciou-se com 100 µL de plasma adicionado de EFV e adição de 10 µL de solução de diazepam em acetonitrila (25 µg/mL) como padrão interno. A extração do EFV compreendeu a precipitação das proteínas realizada com 200 µL de acetonitrila gelada e, em seguida, a amostra foi agitada por 30 segundos e centrifugada a 15294 g durante 15 minutos a 4°C. Recolheu-se 250 µL do sobrenadante que foi filtrado em membrana de PTFE 0,22 µm, que foi evaporado à secura em concentrador – Mivac. As amostras foram ressuspendidas em 50 µL de fase móvel e injetadas no sistema de UPLC nas condições descritas anteriormente.

4.6 Validação do método bioanalítico

O processo de validação foi realizado segundo as normas estabelecidas pela ANVISA (RESOLUÇÃO-RDC nº 27 de 17 de maio de 2012) e pela *Food and Drug Administration* (FDA) através do *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation* de maio de 2001 e do *Draft Guidance* de setembro de 2013. Os parâmetros fundamentais para se determinar os limites de confiança do método, segundo a ANVISA são: limite de detecção (LD), limite inferior de quantificação (LIQ), seletividade, efeito residual, curva de calibração, precisão e exatidão intracorrída e intercorrída, recuperação e estabilidade de armazenamento.

a) Limite de Detecção (LD)

Esse parâmetro é estabelecido através da análise de amostras de concentrações conhecidas e decrescentes de EFV, até o que o sinal detectado seja pelo menos 3 vezes maior que o ruído da linha de base.

b) Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

O limite de quantificação (LIQ) é determinado mediante análises de amostras de concentrações decrescentes de EFV até que a menor concentração que seja precisa (0-20%) e exata (80-120%) em, no mínimo, 5 replicatas. O LIQ é considerado como a concentração, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção ao do analito.

c) Seletividade

A seletividade do método é a capacidade do método de analisar o analito e o padrão interno (PI) na presença dos componentes endógenos comuns a matriz biológica de interesse, garantindo a pureza dos picos cromatográficos. Tem-se que analisar amostras de plasma de, no mínimo, 6 fontes distintas, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada. As respostas dos picos interferentes próximos ao tempo de retenção do EFV devem ser inferiores a 20% da resposta de EFV nas amostras do LIQ e as respostas dos picos interferentes próximo ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% do valor do PI.

d) Efeito residual

O ensaio de efeito residual analisa a ocorrência de contaminações de uma injeção de amostra para outra. Consiste de analisar uma amostra branco seguida de uma amostra do maior ponto da linearidade e novamente se analisa a amostra branco mais duas vezes. Deve ser observado se há picos interferentes no tempo de retenção do analito, que seja superior a 20% da resposta do analito, e do padrão interno, que seja 5% superior a resposta do padrão interno.

e) Curva de calibração (Linearidade)

A curva de calibração foi obtida a partir da razão da área do pico do analito e do PI (área do analito/área do PI) em relação a concentração nominal do analito. A análise das amostras foi feita em triplicata contendo diferentes concentrações de EFV adicionadas de PI, incluindo a análise da amostra branco e da amostra zero. Os critérios de aceitação da linearidade incluíram um coeficiente de correlação $\geq 0,98$ e exatidão de 85% a 115%, exceto para o limite inferior de quantificação (LIQ), para o qual a exatidão deve estar entre 80% e 120%.

A partir da curva de calibração, foram escolhidos os controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM), alto (CQA) e diluído (CQD) que serviram para determinar a precisão e a exatidão.

f) Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas por, no mínimo 5 replicatas, abrangendo as concentrações LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD em intracorridas e intercorridas. A precisão é expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) e a exatidão pode ser obtida pelo erro padrão relativo (EPR). Os critérios de aceitação são de 0-15% para a precisão, exceto para o LIQ que admite valores até 20% e de $\pm 15\%$ para a exatidão, exceto para o LIQ que admite valores de $\pm 20\%$.

g) Recuperação

A recuperação expressa a eficiência do procedimento de extração da amostra em relação ao analito no extrato final do procedimento de preparo, extraído e não

extraído (solução). A recuperação foi calculada pelo percentual da área da amostra extraída de CQA e CQB em relação à amostra não extraída das mesmas concentrações.

h) Estabilidade de Armazenamento

A estabilidade foi avaliada em função da necessidade de armazenamento das amostras após cada coleta e processamento (tempo em que amostra permanece dentro do equipamento). Foi realizado uma análise inicial em triplicata de CQB e CQA recém-preparados. Após o armazenamento, o analito foi considerado estável quando não houve desvio maior que 15% do valor obtido nas amostras recém-preparadas.

A estabilidade de curta duração foi verificada após as amostras permanecerem em temperatura ambiente por tempo superior ao que as amostras em estudo serão mantidas nessas condições no decorrer do estudo, sendo então, processadas e analisadas.

A estabilidade de longa duração foi demonstrada após as amostras serem armazenadas por tempo superior ao intervalo compreendido entre a coleta da primeira amostra e análise da última, por conseguinte, processadas e analisadas. A temperatura utilizada para o ensaio será a mesma temperatura de armazenamento das amostras do estudo.

A estabilidade pós-processamento avaliou a estabilidade do analito na amostra processada para análise, incluindo o padrão interno, na temperatura sob a qual o teste será feito e por tempo superior à duração da corrida analítica. Os resultados serão comparados com os obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

A estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento foi determinada após as amostras serem congeladas a temperatura indicada e mantidas por 12h, depois sendo submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Esse processo foi repetido até contemplar 3 ciclos, quantificando o analito após o terceiro ciclo.

A estabilidade da solução-estoque do fármaco e do padrão interno são estabelecidas após serem mantidas sob as mesmas condições a que serão submetidas as soluções durante uso e armazenamento. Os resultados serão comparados com os obtidos utilizando soluções recentemente preparadas.

4.7 Protocolo Experimental

O protocolo abaixo descrito foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara através do parecer nº 15/2016 (anexo I).

4.7.1 Modelo Animal

Foram utilizados coelhos machos albinos da raça Nova Zelândia, com peso na faixa de 2,5 a 3,8 kg, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista (UNESP). A escolha deste modelo animal se deu devido à facilidade de administração de forma sólida e o uso desta espécie em diversos outros estudos de farmacocinética pré-clínica de fármacos administrados na forma sólida (CHOWDARY et al., 2012)

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 12/12h, luzes acesas às 07h) e tiveram alimento e água a vontade. Os experimentos iniciaram na fase claro e os animais foram privados de alimento por 6 horas anteriores à administração dos medicamentos e por 4 horas após a administração. Ao final dos experimentos, foi realizado a eutanásia dos animais por exposição a gás carbônico (CO_2), conforme recomendação do anexo I da Resolução nº 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Foram utilizados 35 animais distribuídos nos seguintes grupos:

- Grupo Farmacocinética I, tratados com insumo farmacêutico ativo (IFA) EFV, dose única, IV bolus ($n=7$; 2,7 mg/kg). O EFV foi solubilizado em 9,09% de tween 80, 9,09% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 81,82% de tampão de trietanolamina (TRIS) estéril (pH 8,8), tendo volume total de administração de 1100 μL . A dose intravenosa foi obtida através da extrapolação alométrica para coelhos a partir do trabalho de Balani et al (1998), que usou dose de 5 mg/kg em ratos wistar;

- Grupo Farmacocinética II, tratados com EFV-IFA, dose única, V.O na forma de cápsula (n=7, 50 mg);
- Grupo Farmacocinética III, tratados com EFV-HDL na forma de cápsula, dose única, V.O (n=7, 50 mg);
- Grupo Farmacocinética IV, tratados com associação de EFV-IFA, lamivudina e tenofovir, dose única, V.O na forma de cápsula (n=7, 50 mg, 25 mg e 25 mg);
- Grupo Farmacocinética V, tratados com associação de EFV-HDL, lamivudina e tenofovir, dose única, V.O na forma de cápsula (n=7, 50 mg, 25 mg e 25 mg);

A dose oral do experimento foi calculada por extrapolação alométrica com base na dose máxima em humanos (70 Kg), de 600 mg (8,6 mg/Kg) e 300 mg para lamivudina e tenofovir (4,3 mg/kg).

O cálculo da dose por extrapolação alométrica é feito com base na taxa metabólica basal (TMB) do animal em função do peso metabólico ($M^{0,75}$) multiplicado pela constante da espécie (K), como está demonstrando a **equação 2**:

(Eq. 2)

$$TMB = K \times M^{0,75}$$

Em que “K” é a constante teórica de proporcionalidade dependente da espécie e baseada na temperatura corporal, “M” é a massa corporal e “0,75” é a inclinação da curva de relação entre as variáveis massa e taxa metabólica, conhecida como “Lei de Kleiber” ou Lei da potência $\frac{3}{4}$ ”.

Os grupos I e II foram conduzidos em conjunto com o mestrando Jonata Augusto de Oliveira, que desenvolveu o trabalho intitulado “Farmacocinética do efavirenz em coelhos: estudo comparativo de formas farmacêuticas sólidas”, nesta mesma instituição sob orientação da Prof. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini.

4.7.2 Cápsulas de EFV

Neste estudo foram utilizados quatro tipos diferentes de cápsulas de EFV que foram produzidas e cedidas pelo Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM) da Universidade Federal de Pernambuco.

- Grupo farmacocinético II: foram preparadas cápsulas (nº 00) contendo 50 mg de EFV puro.
- Grupo farmacocinético III: foram preparadas cápsulas (nº 00) contendo 50 mg de EFV incorporados ao sistema HDL, descrito por Fontes e colaboradores (2016).
- Grupo farmacocinético IV: foram preparadas cápsulas (nº 00) contendo 50 mg de EFV, 25 mg de TNF e 25 mg 3TC.
- Grupo farmacocinético V: foram preparadas cápsulas (nº 00) contendo 50 mg de EFV incorporados ao sistema HDL (FONTES et al., 2016), 25 mg de TNF e 25 mg 3TC.

4.7.3 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 EFV 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:

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

$$n \geq [t(0,05, 8) + t(0,1, 8)]^2 \times (13,24/20)^2$$

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

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

Utilizou-se o resultado obtido para a iteração:

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

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

Utilizou-se o resultado obtido para a iteração:

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

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

Consideramos o número mínimo de 7 replicatas por tempo para obtenção de resultados de qualidade sob o ponto de vista estatístico.

4.7.4 Administração por via oral

As cápsulas de EFV foram administradas em dose única na porção inicial do esôfago dos coelhos utilizando um *pill dispenser* (dispositivo utilizado na clínica veterinária para administração de comprimidos), com volume fixo de 10 mL de água filtrada, após jejum de 6 horas, com livre acesso à água e ração 4 horas após a administração do fármaco. Este procedimento permite a administração de cápsulas sem a ocorrência de trituração devido à mastigação da forma sólida pelo animal, mantendo assim a forma farmacêutica intacta para que não ocorram alterações nos processos de desintegração e dissolução das cápsulas e, conseqüentemente, na absorção do fármaco.

4.7.5 Administração intravenosa

Os animais deste grupo receberam o insumo farmacêutico ativo EFV por administração IV *bolus* na veia auricular marginal, em dose única, após jejum de 6 horas, com livre acesso a água e ração 4 horas após a administração do fármaco. O grupo IV foi acrescido ao estudo para o cálculo de biodisponibilidade absoluta (F_{oral}) EFV. Como veículo para administração IV, foi utilizado 9,09% de dimetilsulfóxido (DMSO), 9,09% de tween 80 e 81,82% de tampão de trietanolamina (TRIS) estéril (pH 8,8), tendo volume total de administração de 1100 μ L. Esta pré-formulação para administração IV foi necessária devido à baixa solubilidade aquosa do EFV. A porcentagem do co-solvente DMSO foi estabelecida de acordo com o trabalho de Galvão e colaboradores (2014), que considera que concentrações menores que 10% de DMSO não apresentam toxicidade relevante, permitindo sua utilização como co-solvente universal.

4.7.6 Coleta de sangue

Após a administração, foram realizadas coletas seriadas de sangue em tubos heparinizados (5 µL de heparina 50% Lique mine® 5000 UI Roche) através da artéria auricular central, utilizando seringas de 1 mL com agulha 29G ½ (13 mm x 0,33 mm). O sangue foi coletado nos seguintes tempos estabelecidos para cada grupo:

- Grupo farmacocinética I (administração intravenosa de EFV-IFA): tempos de 5; 15; 30; 45; 60; 90; 120; 180; 240; 360; 480; 600; 720; 1080; 1440 minutos após administração;
- Grupo farmacocinética II (administração oral de EFV-IFA): tempos de 10; 20; 30; 45; 60; 90; 120; 180; 240; 360; 480; 600; 720; 1080; 1440 minutos após administração;
- Grupo farmacocinética III (administração oral de EFV-HDL): tempos de 10; 20; 30; 45; 60; 90; 120; 180; 240; 360; 480; 600; 720; 1080; 1440, 1800; 2880 minutos após administração;
- Grupo farmacocinética IV (administração oral de EFV-IFA associado a TNF e 3TC): tempos de 10; 20; 30; 45; 60; 90; 120; 180; 240; 360; 480; 600; 720; 1080; 1440, 1800; 2880 minutos após administração;
- Grupo farmacocinética V (administração oral de EFV-HDL associado a TNF e 3TC): tempos de 10; 20; 30; 45; 60; 90; 120; 180; 240; 360; 480; 600; 720; 1080; 1440, 1800; 2880 minutos após administração.

Alíquotas de 500 µL de sangue foram centrifugadas a 6.000xg por 3 minutos e 100 µL de plasma foram retirados em duplicata e imediatamente estocados a -20°C por período previamente testado nos estudos de estabilidade da validação bioanalítica. O volume de sangue coletado de cada animal não ultrapassou o volume máximo recomendado (7,5% do volume total) (DIEHL et al., 2001), permitindo assim, que os animais ficassem em condições hematológicas e fisiológicas normais durante todo o experimento.

4.7.7 Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos a partir das curvas de concentração plasmática *versus* tempo. Após inspeção visual e avaliação do

coeficiente de correlação das curvas, o modelo farmacocinético escolhido foi o monocompartimental. Os parâmetros foram calculados como está demonstrado na **tabela 1**:

Tabela 1 – Descrição dos parâmetros farmacocinéticos

Parâmetros	Descrição	Equação ou método de cálculo
ASC_{0-t}	Área sob a curva de zero ao último tempo quantificável	Métodos dos Trapezoides
$ASC_{0-\infty}$	Área sob a curva de zero extrapolado ao infinito	$ASC_{0-t} + C_n/k_{el}$, C_n é a última concentração quantificável
$ASMC_{0-t}$	Área sob o momento da curva de zero ao último tempo quantificável	Método da Estatística dos Momentos
$ASMC_{0-\infty}$	Área sob o momento da curva de zero extrapolada ao infinito	$ASMC_{0-t} + ((C_n \times t_n)/k_{el}) + (C_n/k_{el}^2)$, t_n é o tempo de ocorrência de C_n
K_{el}	Constante de eliminação	Método gráfico
$T_{1/2}$	Meia-vida de eliminação	$\ln 2/k_{el}$
K_a	Constante de absorção	Método gráfico
$T_{1/2ab}$	Meia-vida de absorção	$\ln 2/k_a$
T_{lag}	Tempo para início da absorção	$\ln (A/B)/(A-B)$
MTT	Tempo de trânsito médio	$ASMC_{0-\infty}/ASC_{0-\infty}$
MAT	Tempo médio de absorção	$1/k_a$
MRT	Tempo de residência médio	MTT – MAT
Cl	Clearance total	$DOSE \times F / ASC_{0-\infty}$
$V_{d\acute{a}rea}$	Volume de distribuição calculado pela ASC	Cl/k_{el}
V_c	Volume de distribuição central	$DOSE \times F / A$ ou B
$C_{m\acute{a}x}$	Concentração plasmática máxima	Método gráfico
$t_{m\acute{a}x}$	Tempo para ocorrência da $C_{m\acute{a}x}$	Método gráfico
Foral	Biodisponibilidade absoluta	$ASC_{0-\infty} (oral) \times DOSE(i.v.) / ASC_{0-\infty} (i.v.) \times DOSE(oral)$

Fonte: do autor.

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados pelo Excel® e confirmados pelo Phoenix®.

4.7.8 Análise estatística

Os resultados dos parâmetros farmacocinéticos de cada grupo estão apresentados através das médias e intervalo de confiança 95%. Foi empregado o teste de *Kruskal-Wallis*, uma análise de variância não paramétrica utilizada na comparação de três ou mais amostras independentes. A diferença foi confirmada através do teste de comparações múltiplas de Dunn, com nível de significância fixado em 5% para a comparação entre os grupos. Também foi aplicado o teste t não pareado e não paramétrico (*Mann-Whitney test*) para comparação de parâmetros entre os grupos. As comparações estatísticas foram realizadas através da aplicação dos softwares GraphPad InStat® e Origin®.

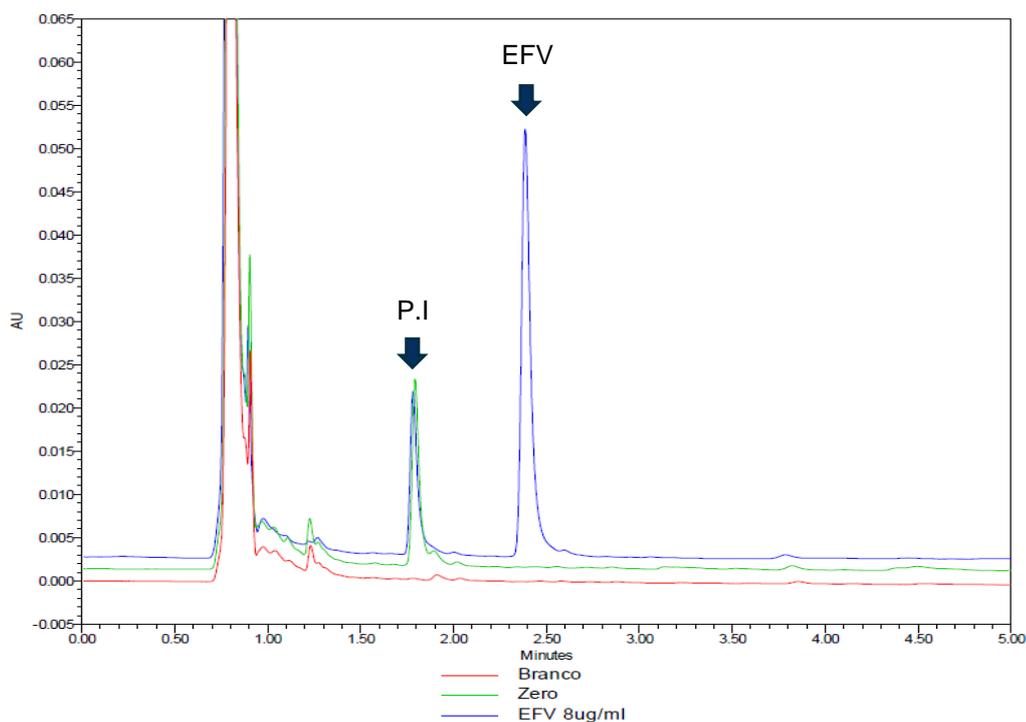
5 Resultados e Discussão

5.1 Validação de método bioanalítico em plasma de coelhos

5.1.1 Seletividade

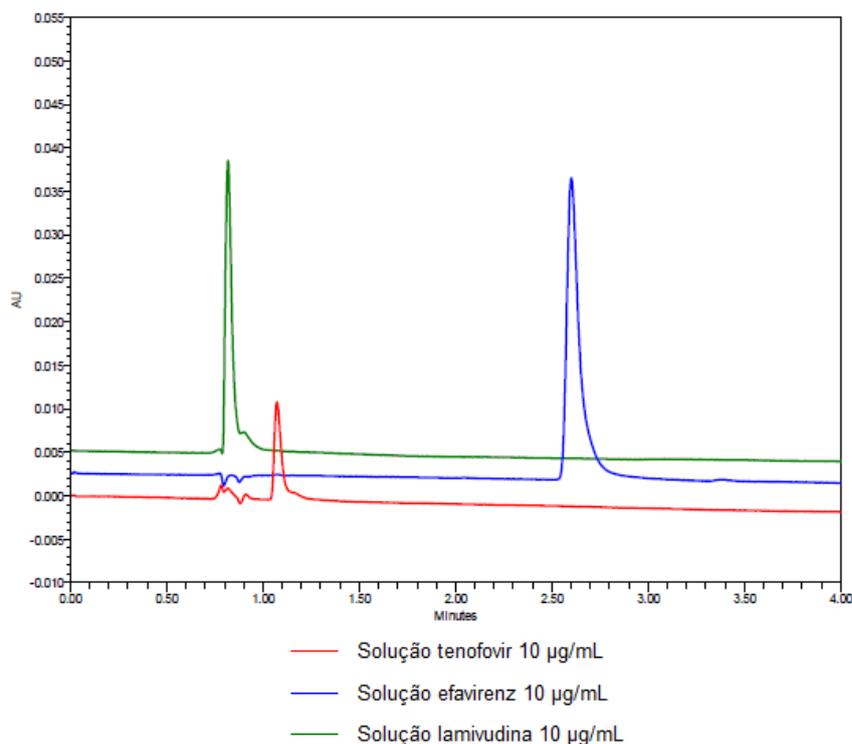
O ensaio de seletividade avaliou a capacidade do método em diferenciar e quantificar os analitos de interesse na presença de outros componentes na amostra. O método bioanalítico mostrou-se seletivo como pode ser visto na **figura 8**, em que está apresentado a sobreposição de cromatogramas de amostra de plasma branco, zero e de EFV na concentração de 8,0 µg/mL. O tempo de retenção (Tr) do PI foi em 1,80 minutos e Tr de EFV foi de aproximadamente 2,40 minutos. O plasma branco apresentou respostas de picos interferentes próximos aos tempos de retenção do PI e de EFV de 3% e 10%, respectivamente, sendo inferior ao limite estabelecido de 5% da área do PI e 20% da área do LIQ (0,078 µg/mL). Outros componentes como lamivudina (Tr = 0,8 min) e tenofovir (Tr = 1,08 min) também não interferiram na seletividade do método (**figura 9**).

Figura 8 - Cromatogramas sobrepostos de amostras branco, zero e de EFV (8 µg/mL).



Fonte: do autor (2018).

Figura 9 – Cromatogramas de soluções de tenofovir, lamivudina e efavirenz (10 µg/mL).

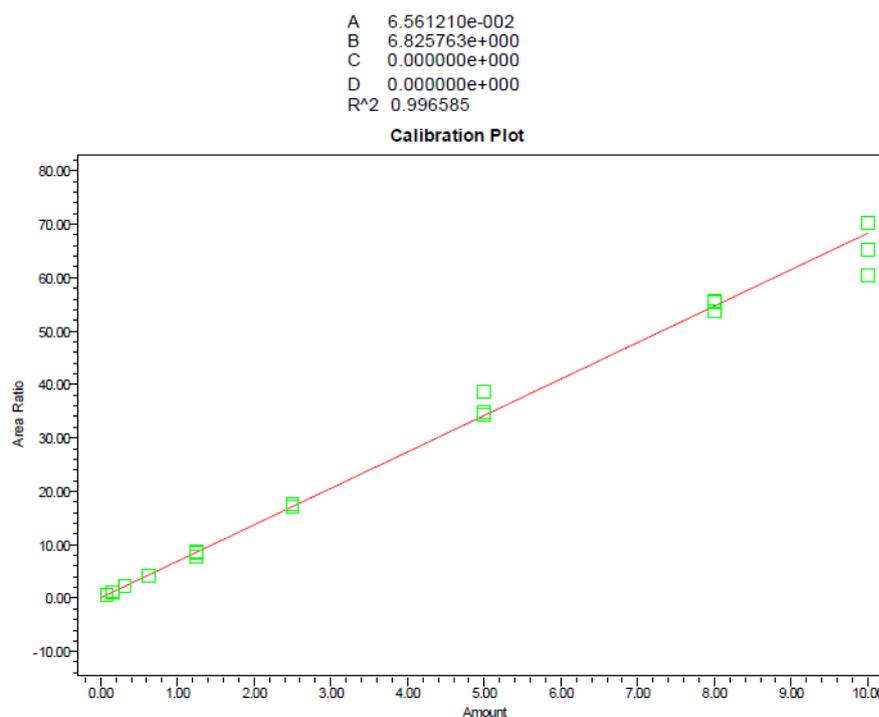


Fonte: do autor (2018).

5.1.2 Curva de calibração

A curva de calibração foi construída plotando-se a razão da área do pico de EFV pela área do pico do padrão interno no eixo y e as concentrações nominais do analito no eixo x. Assim, obteve-se a equação por regressão linear que permite calcular a concentração de valores desconhecidos do analito pela interpolação das razões de área e padrão interno na equação da reta. Na **figura 10**, está apresentado a curva de calibração construída com 9 níveis de concentrações diferentes em triplicata.

Figura 10 - Curva de calibração de EFV em plasma



Fonte: do autor (2018).

A equação da reta foi $y = 6,8257x + 0,0656$, obtida por ponderação ($1/x^2$) e seu coeficiente de determinação (r^2) foi de 0,9965. Na **tabela 2**, são apresentadas as concentrações nominais da curva de calibração e seus valores de precisão e exatidão obtidos a partir do ajuste pelo modelo de regressão ponderado para normalizar a tendência da reta.

Tabela 2 - Concentrações da curva de calibração

Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV%)	Exatidão (ERP)
0,078	4,41	-1,55
0,156	1,86	2,73
0,313	5,03	2,61
0,625	2,34	-2,72
1,25	5,32	-3,16
2,5	1,25	0,69
5,0	6,62	5,20
8,0	1,88	0,52
10,0	7,59	-4,32

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

ERP= [concentração experimental - concentração nominal / concentração nominal) x 100]

Fonte: do autor (2018).

A curva de calibração atendeu os critérios de aceitação, apresentando erro padrão relativo na faixa de **-4,32%** e **5,20%**. O LIQ foi de 0,078 µg/mL, pois foi a menor concentração com precisão (CV%= 4,41) e exatidão (ERP= -1,55%) dentro dos critérios de aceitação.

5.1.3 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas por meio do LIQ (0,078 µg/mL) e dos controles de qualidade CQB (0,15 µg/mL), CQM (1,25 µg/mL), CQA (8,0 µg/mL) e QLD (2,0 µg/mL) de acordo com a **tabela 3**.

Tabela 3 - Precisão e exatidão do método bioanalítico

		Concentração nominal (µg/mL)				
		0,078 LQ	0,15 CQB	1,25 CQM	2,0 QLD	8,0 CQA
intracorrída (n=5)	Precisão (CV%)	8,20	4,64	4,12	4,31	4,07
	Exatidão (ERP)	-4,00	-0,16	-1,28	-4,8	-2,775
intercorrída (n=15)	Precisão (CV%)	16,39	10,85	7,50	6,18	6,41
	Exatidão (ERP)	4,96	5,6	9,36	3,20	0,30

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

ERP= [concentração experimental - concentração nominal / concentração nominal) x 100]

Fonte: do autor (2018).

5.1.4 Efeito Residual

No ensaio de efeito residual, não foram observados picos residuais no tempo de retenção do analito e do padrão interno após injeção do CQA seguido de amostra branco.

5.1.5 Recuperação

A eficiência do método de extração foi observada através dos resultados obtidos de amostras de CQB, CQM e CQA processadas e comparadas com solução padrão do analito, que representaram 100% de recuperação. A recuperação de EFV do plasma foi acima de 60%, embora o ideal seja próximo de 100%, foi satisfatório para análise farmacocinética. Na **tabela 4**, estão apresentados os resultados de recuperação e seus respectivos valores de precisão (CV%) e exatidão (EPR%).

Tabela 4 - Ensaio de recuperação de EFV em plasma.

Controle de Qualidade	Recuperação	CV%*
CQB	60,48	13,64 / 1,637908
CQM	83,82	10,62 / 2,610909
CQA	83,87	14,21 / 0,813003
Média	76,06	

*: CV da triplicata de CQ em plasma / CV da triplicata em solução.

Fonte: do autor (2018).

5.1.6 Estabilidade de armazenamento

O ensaio de estabilidade de armazenamento em plasma na validação do método bioanalítico tem a função de determinar em que condições as amostras que serão quantificadas podem ser estocadas. Portanto, após a coleta de uma amostra ela deve ser armazenada em uma condição que tenha sido avaliada neste ensaio. Na **tabela 5**, estão apresentados os resultados dos ensaios de estabilidade de EFV em plasma.

Tabela 5 - Estabilidade de armazenamento de EFV em plasma.

	CQB	CQA
Curta duração (6h em temperatura ambiente)		
N=3		
ERP (%)	+2,08	+1,84
CV (%)	12,41	7,33
Longa duração (27 dias a -20°C)		
N=3		
ERP (%)	+2,08	+2,14
CV (%)	6,10	3,31
Pós processamento (3h a 10°C)		
N=3		
ERP (%)	+5,44	+6,39
CV (%)	3,89	5,52
Ciclo de Congelamento e Descongelação (-20°C)		
N=3		
ERP (%)	+14,00	-8,55
CV (%)	1,55	6,28

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

ERP= [concentração experimental - concentração nominal / concentração nominal) x 100]

Fonte: do autor (2018).

Os resultados obtidos estavam dentro dos limites aceitáveis considerando a legislação vigente e, assim, as condições de armazenagem testadas foram consideradas adequadas para evitar a degradação do analito em plasma.

5.2 Análise Farmacocinética

5.2.1 Grupo farmacocinética I (administração intravenosa de EFV)

A administração intravenosa de 2,7 mg/kg de EFV nos coelhos permitiu a construção de uma curva de concentração plasmática *versus* tempo obtida através da análise das amostras coletadas. Na **tabela 6**, estão representados os valores de concentração plasmática média *versus* tempo dos animais do grupo.

Tabela 6 - Valores de concentração plasmática de EFV *versus* tempo na administração intravenosa em dose única de 2,7 mg/Kg (média, n = 7, DP= desvio padrão).

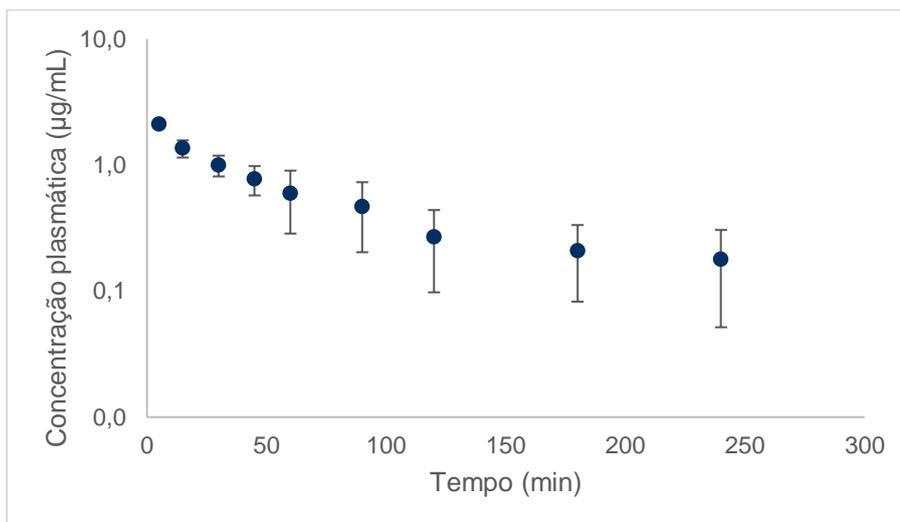
Tempos (min)	Concentração plasmática (µg/mL)	± DP
5	2,124	0,068
15	1,359	0,212
30	1,000	0,188
45	0,778	0,203
60	0,595	0,308
90	0,467	0,264
120	0,269	0,171
180	0,208	0,126
240	0,179	0,127

*Tempo "0" foi obtido a partir da extrapolação da reta ao eixo y.

Fonte: do autor (2018).

Na **figura 11**, está a representação gráfica do perfil farmacocinético de EFV obtido na administração intravenosa da dose de 2,7 mg/Kg em coelhos.

Figura 11 - Perfil farmacocinético de EFV na administração intravenosa em dose única de 2,7 mg/Kg em coelhos (média ± DP, n = 7).



Fonte: do autor (2018).

A análise do perfil farmacocinético de EFV no grupo intravenoso mostra uma velocidade de decaimento, permitindo utilizar o modelo monocompartimental para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos (**tabela 7**).

Tabela 7 - Parâmetros farmacocinéticos da administração IV de EFV em dose única de 2,7 mg/Kg em coelhos (n = 7, média ± IC 95).

Parâmetros	Unidade	Média (± IC 95)
K_{el}	Min^{-1}	0,0132 (0,0081 – 0,0182)
$T_{1/2}$	Min	60,85 (36,80 – 84,90)
$ASC_{0-\infty}$	$\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$	133,45 (76,87 – 190,02)
Cl	$\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$	22,64 (16,68 – 28,60)
$V_{d\text{área}}$	mL/kg	1791,85 (1485,80 – 2097,90)
V_c	mL/kg	1826,89 (1512,80 – 2141,00)
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 do tempo zero ao infinito, Cl: clearance total, $V_{d\text{área}}$: volume de distribuição calculado pela ASC, V_c : volume de distribuição central, MRT: tempo de residência médio.

Fonte: do autor (2018).

5.2.2 Grupo farmacocinética II (administração oral de EFV-IFA)

A administração oral de 50 mg de EFV-IFA na forma farmacêutica de cápsulas permitiu a construção de uma curva de concentração plasmática *versus* tempo obtida através da análise das amostras coletadas. Na **tabela 8**, estão representados os valores de concentração plasmática média *versus* tempo dos animais do grupo. Nota-se uma alta variabilidade interindividual das concentrações conforme já descrito na literatura devido a absorção errática do fármaco pela sua baixa solubilidade na luz do trato gastrointestinal. Isto pode aumentar o risco de efeitos adversos no sistema nervoso central (SNC) ou falha virológica (MARZOLINI, 2001; CHO, 2011).

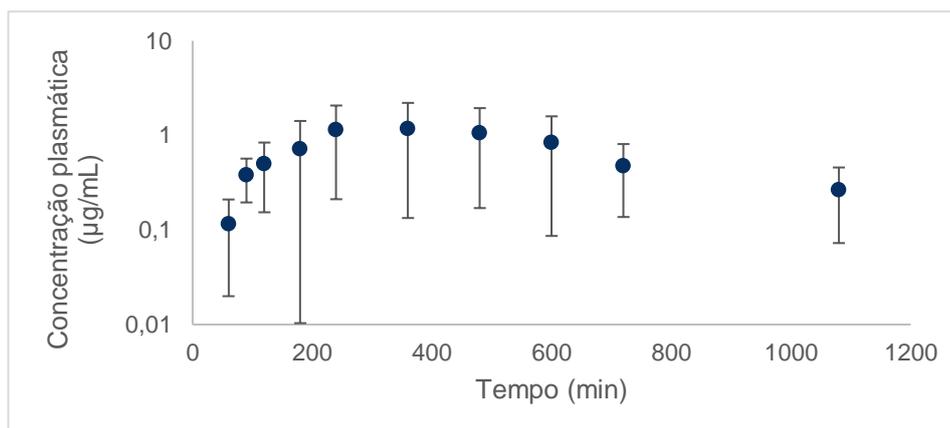
Tabela 8 - Valores de concentração plasmática de EFV *versus* tempo na administração de cápsulas de 50 mg de EFV-IFA em coelhos (média, n = 7, DP= desvio padrão).

Tempos (min)	Concentração plasmática (µg/mL)	± DP
0	0	0
60	0,115	0,095
120	0,382	0,186
180	0,497	0,343
240	0,716	0,705
360	1,140	0,929
480	1,170	1,036
600	1,057	0,886
720	0,839	0,752
1080	0,473	0,336
1440	0,265	0,193

Fonte: do autor (2018).

Na **figura 12**, está a representação gráfica do perfil farmacocinético de EFV obtido na administração oral da dose de 50 mg de EFV-IFA em coelhos e, a seguir, estão apresentados os parâmetros farmacocinéticos calculados para este grupo de animais (**tabela 9**).

Figura 12 - Perfil farmacocinético de EFV na administração de 50 mg de EFV-IFA em dose única em coelhos (média \pm DP, n = 7).



Fonte: do autor (2018).

Tabela 9 - Parâmetros farmacocinéticos da administração oral de EFV-IFA em dose única de 50 mg em coelhos (n = 7, média \pm IC 95).

Parâmetros	Unidade	Média (\pm IC 95)
ASC _{0-inf}	$\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$	1106,42 (394,99 – 1817,90)
K _{el}	Min ⁻¹	0,0022 (0,0006 – 0,0037)
T _{1/2}	Min	624,28 (2,758 – 1245,80)
K _a	Min ⁻¹	0,0037 (0,0009 – 0,0065)
T _{1/2 a}	Min	290,72 (65,22 – 516,22)
T _{lag}	Min	0,75 (-0,092 – 1,59)
MTT	Min	900,84 (3,98 – 179,70)
MAT	Min	419,50 (94,11 – 744,90)
MRT	Min	677,18 (-78,64 – 1433,00)
T _{máx}	Min	370 (254,45 – 485,55)
C _{máx}	$\mu\text{g/mL}$	1,46 (0,5 – 2,41)
Cl	mL/min/kg	29,76 (6,85 – 52,65)
V _d _{área}	mL/kg	20517,97 (2441,00 – 3895,00)
V _c	mL/kg	16460 (-2903,80 – 35824,00)
F _{oral}	%	1,34 (0,50 – 2,19)

K_{el}: constante de eliminação, T_{1/2}: meia-vida de eliminação, K_a: constante de absorção, T_{1/2 a}: meia-vida de absorção, T_{lag}: tempo para o início da absorção, MRT: tempo de residência médio, MAT: tempo de absorção médio, MTT: tempo de trânsito médio, T_{máx}: tempo de ocorrência de C_{máx}, C_{máx}: concentração plasmática máxima, Cl: clearance total, V_d_{área}: volume de distribuição calculado pela ASC, V_c: volume de distribuição central, F: biodisponibilidade. Fonte: do autor (2018).

5.2.3 Grupo farmacocinética III (administração oral de EFV-HDL)

A administração oral de 50 mg de EFV incorporado em HDL na forma farmacêutica de cápsulas permitiu a construção de uma curva de concentração plasmática *versus* tempo obtida através da análise das amostras coletadas. Na **tabela 10**, estão representados os valores de concentração plasmática média *versus* tempo dos animais do grupo. Nota-se que a variabilidade das concentrações de EFV foi menor quando comparado ao grupo II, o que indica que houve melhora da solubilidade do fármaco incorporado ao HDL, além de garantir o sucesso do tratamento e evitar efeitos tóxicos.

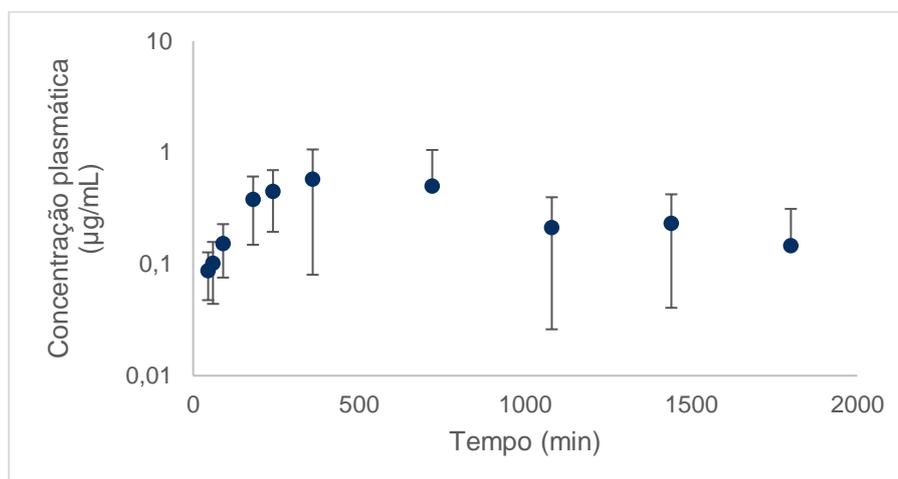
Tabela 10 - Valores de concentração plasmática de EFV *versus* tempo na administração de cápsulas de 50 mg de EFV-HDL em coelhos (média, n = 7, DP= desvio padrão).

Tempos (min)	Concentração plasmática (µg/mL)	± DP
0	0	0
45	0,088	0,040
60	0,101	0,057
90	0,152	0,076
120	0,413	0,627
180	0,380	0,230
240	0,445	0,251
360	0,574	0,493
480	0,403	0,416
600	0,385	0,537
720	0,499	0,556
1080	0,212	0,186
1440	0,232	0,191
1800	0,146	0,166

Fonte: do autor (2018).

Na **figura 13**, está a representação gráfica do perfil farmacocinético de EFV obtido na administração oral da dose de 50 mg de EFV-HDL em coelhos e, a seguir, estão apresentados os parâmetros farmacocinéticos calculados para este grupo de animais (**tabela 11**).

Figura 13 - Perfil farmacocinético de EFV na administração de 50 mg de EFV-HDL em dose única em coelhos (média \pm DP, n = 7).



Fonte: do autor (2018).

Tabela 11 - Parâmetros farmacocinéticos da administração oral de EFV-HDL em dose única de 50 mg em coelhos (n = 7, média \pm IC 95).

Parâmetros	Unidade	Média (\pm IC 95)
ASC _{0-inf}	$\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$	379,55 (201,57 – 557,52)
K _{el}	Min ⁻¹	0,0032 (0,0005 – 0,0059)
T _{1/2}	Min	339,83 (109,99 – 569,68)
K _a	Min ⁻¹	0,0098 (0,0012 – 0,0184)
T _{1/2 a}	Min	127,37 (19,97 – 234,76)
T _{lag}	Min	1,86 (0,32 – 3,39)
MTT	Min	812,21 (421,44 – 1203,00)
MAT	Min	183,79 (28,82 – 338,76)
MRT	Min	628,42 (200,86 – 1056,00)
T _{máx}	Min	411,43 (243,63 – 579,22)
C _{máx}	$\mu\text{g/mL}$	0,84 (0,38 – 1,29)
Cl	mL/min/kg	25,68 (9,64 – 41,73)
V _d área	mL/kg	13941,22 (-840,37 – 28723,00)
V _c	mL/kg	13529,46 (-4849,10 – 31908,00)
F _{oral}	%	0,44 (0,21 – 0,67)

K_{el}: constante de eliminação, T_{1/2}: meia-vida de eliminação, K_a: constante de absorção, T_{1/2 a}: meia-vida de absorção, T_{lag}: tempo para o início da absorção, MRT: tempo de residência médio, MAT: tempo de absorção médio, MTT: tempo de trânsito médio, T_{máx}: tempo de ocorrência de C_{máx}, C_{máx}: concentração plasmática máxima, Cl: clearance total, V_dárea: volume de

distribuição calculado pela ASC, V_c : volume de distribuição central, F_{oral} : biodisponibilidade.

Fonte: do autor (2018).

5.2.4 Grupo farmacocinética IV (administração oral de EFV-IFA associado a TNF e 3TC)

A administração oral de 50 mg de EFV-IFA associado a TNF e 3TC na forma farmacêutica de cápsulas permitiu a construção de uma curva de concentração plasmática versus tempo obtida através da análise das amostras coletadas. Na **tabela 12**, estão representados os valores de concentração plasmática média versus tempo dos animais do grupo. Nota-se que a variabilidade das concentrações de EFV foi menor quando comparado ao grupo II e semelhante ao grupo III, o que sugere melhora da solubilidade devido a mistura de pós dos fármacos em associação.

Tabela 12 - Valores de concentração plasmática de EFV versus tempo na administração de cápsulas de 50 mg de EFV-IFA + TNF/3TC em coelhos (média, n = 7, DP= desvio padrão).

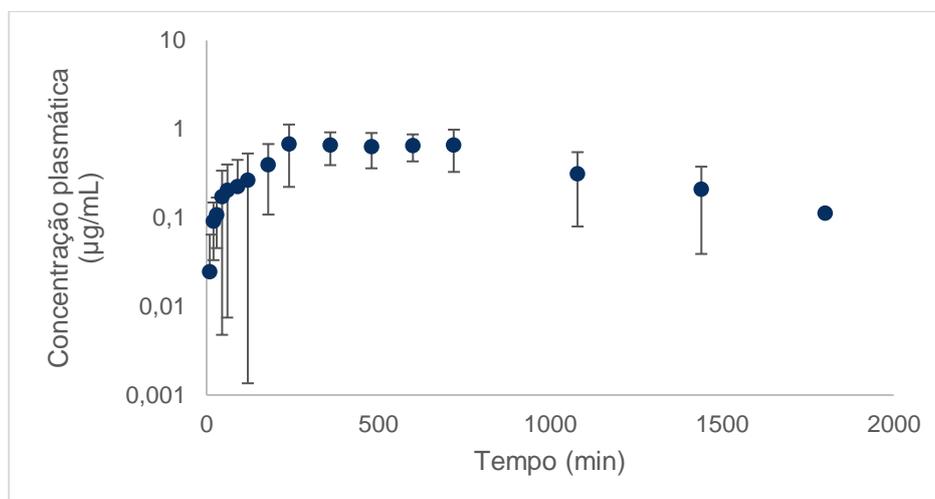
Tempos (min)	Concentração plasmática ($\mu\text{g/mL}$)	\pm DP
0	0	0
10	0,0245	0,040
20	0,0908	0,057
30	0,107	0,062
45	0,172	0,167
60	0,203	0,196
90	0,224	0,226
120	0,266	0,265
180	0,393	0,285
240	0,674	0,452
360	0,656	0,263
480	0,633	0,272
600	0,652	0,220
720	0,657	0,328
1080	0,314	0,235
1440	0,208	0,170
1800	0,112	0

Fonte: do autor (2018).

Na **figura 14**, está a representação gráfica do perfil farmacocinético de EFV obtido na administração oral da dose de 50 mg de EFV-IFA + TNF/3TC em coelhos e,

a seguir, estão apresentados os parâmetros farmacocinéticos calculados para este grupo de animais (**tabela 13**).

Figura 14 - Perfil farmacocinético de EFV na administração de 50 mg de EFV-IFA + TNF/3TC em dose única em coelhos (média \pm DP, n = 7).



Fonte: do autor (2018).

Tabela 13 - Parâmetros farmacocinéticos da administração oral de EFV-IFA + TNF/3TC em dose única de 50 mg em coelhos (n = 7, média \pm IC 95).

Parâmetros	Unidade	Média (\pm IC 95)
ASC _{0-inf}	$\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$	784,03 (457,75 – 1110,3)
K _{el}	Min ⁻¹	0,0019 (0,0013 – 0,0025)
T _{1/2}	Min	398,88 (285,93 – 511,82)
K _a	Min ⁻¹	0,0049 (0,0009 – 0,0088)
T _{1/2 a}	Min	189,73 (107,76 – 271,70)
T _{lag}	Min	2,56 (1,84 – 3,29)
MTT	Min	834,88 (622,27 – 1047,50)
MAT	Min	273,78 (155,50 – 392,06)
MRT	Min	520,78 (362,30 – 679,28)
T _{máx}	Min	462,86 (288,21 – 637,50)
C _{máx}	$\mu\text{g/ML}$	0,95 (0,74 – 1,17)
Cl	mL/min/kg	24,26 (14,25 – 34,27)
V _d _{área}	mL/kg	12723,34 (8888,8 – 16558,0)
V _C	mL/kg	7890,52 (5362,5 – 10419,0)
F _{oral}	%	1,00 (0,57 – 1,43)

K_{el} : constante de eliminação, $T_{1/2}$: meia-vida de eliminação, K_a : constante de absorção, $T_{1/2 a}$: meia-vida de absorção, T_{lag} : tempo para o início da absorção, MRT: tempo de residência médio, MAT: tempo de absorção médio, MTT: tempo de trânsito médio, $T_{máx}$: tempo de ocorrência de $C_{máx}$, $C_{máx}$: concentração plasmática máxima, Cl: clearance total, $V_{d\text{área}}$: volume de distribuição calculado pela ASC, V_c : volume de distribuição central, F_{oral} : biodisponibilidade.

Fonte: do autor (2018).

5.2.5 Grupo farmacocinética V (administração oral de EFV-HDL associado a TNF e 3TC)

A administração oral de 50 mg de EFV incorporado ao HDL e associado a 25 mg de TNF e 3TC na forma farmacêutica de cápsulas permitiu a construção de uma curva de concentração plasmática versus tempo obtida através da análise das amostras coletadas. Na **tabela 14**, estão representados os valores de concentração plasmática média versus tempo dos animais do grupo.

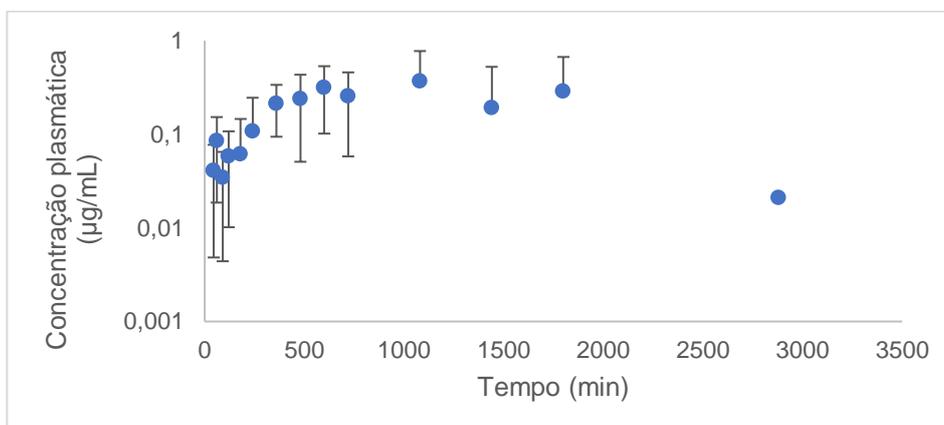
Tabela 14 - Valores de concentração plasmática de EFV versus tempo na administração de cápsulas de 50 mg de EFV-HDL+ 25mg de TNF/3TC em coelhos (média, n = 7, DP= desvio padrão).

Tempos (min)	Concentração plasmática ($\mu\text{g/mL}$)	\pm DP
0	0	0
45	0,041	0,036
60	0,085	0,067
90	0,034	0,030
120	0,059	0,049
180	0,062	0,084
240	0,109	0,136
360	0,215	0,121
480	0,241	0,191
600	0,317	0,216
720	0,258	0,199
1080	0,369	0,404
1440	0,193	0,332
1800	0,291	0,378
2880	0,0211	0

Fonte: do autor (2018).

Na **figura 15**, está a representação gráfica do perfil farmacocinético de EFV obtido na administração oral da dose de 50 mg de EFV-HDL + 25 mg de TNF/3TC em coelhos e, a seguir, estão apresentados os parâmetros farmacocinéticos calculados para este grupo de animais (**tabela 15**).

Figura 15 - Perfil farmacocinético de EFV na administração de 50 mg de EFV-HDL + 25 mg de TNF/3TC em dose única em coelhos (média \pm DP, n = 7).



Fonte: do autor (2018).

Tabela 15 - Parâmetros farmacocinéticos da administração oral de EFV-HDL + TNF/3TC em dose única de 50 mg em coelhos (n = 7, média \pm IC 95).

Parâmetros	Unidade	Média (\pm IC 95)
ASC _{0-inf}	$\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$	529,53 (99,89 – 959,13)
K _{el}	Min ⁻¹	0,0028 (0,0015 – 0,0040)
T _{1/2}	Min	302,27 (176,73 – 427,81)
K _a	Min ⁻¹	0,0040 (0,0024 – 0,0057)
T _{1/2 a}	Min	212,45 (106,28 – 318,21)
T _{lag}	Min	0,78 (-0,146 – 1,7)
MTT	Min	895,39 (33,86%)
MAT	Min	306,27 (153,36 – 459,18)
MRT	Min	589,12 (406,72 – 771,53)
T _{máx}	Min	651,43 (351,86 – 951,00)
C _{máx}	$\mu\text{g/ML}$	0,90 (0,23 – 1,58)
Cl	mL/min/kg	38,16 (12,76 – 63,56)
V _d área	mL/kg	15831 (3055,80 – 28607,00)
V _c	mL/kg	17167 (-15449 – 49583)
F _{oral}	%	0,70 (0,14 – 1,26)

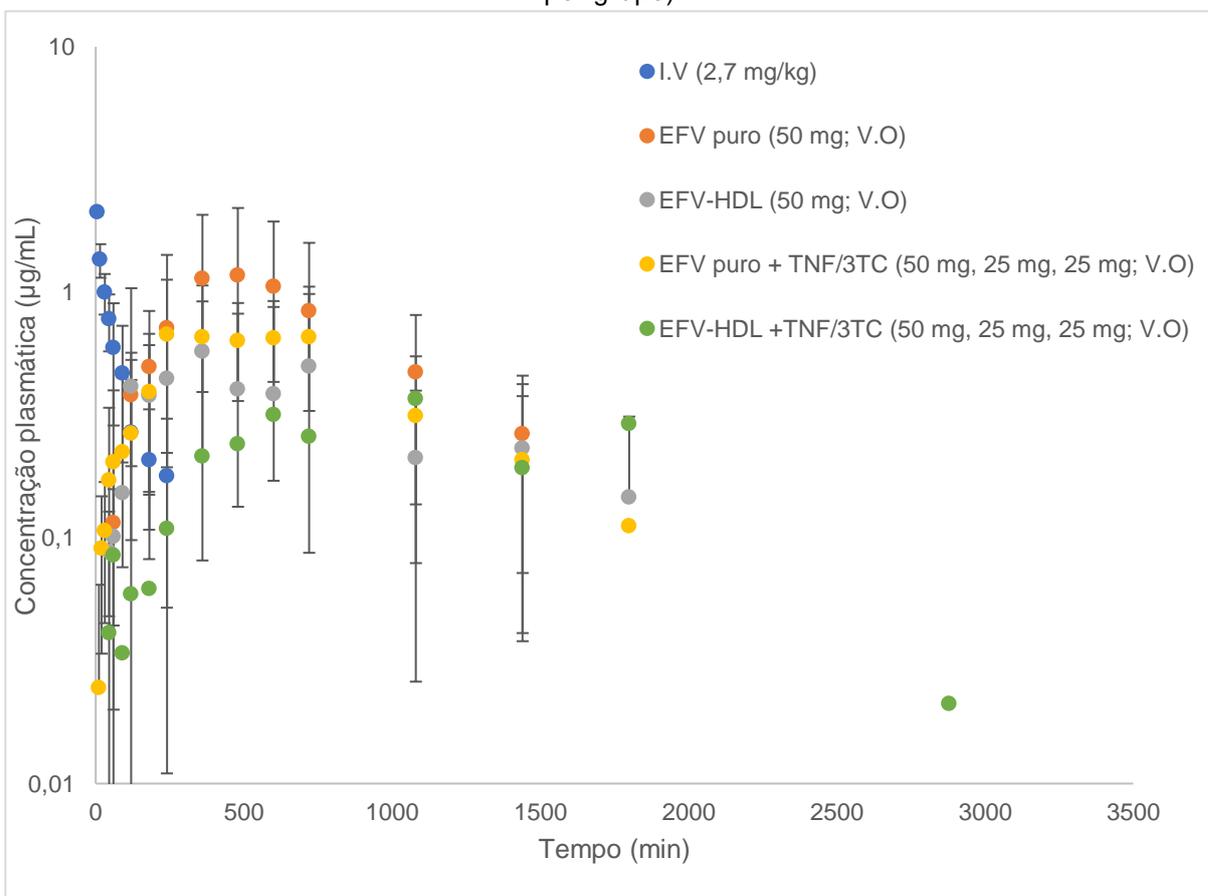
K_{el} : constante de eliminação, $T_{1/2}$: meia-vida de eliminação, K_a : constante de absorção, $T_{1/2a}$: meia-vida de absorção, T_{lag} : tempo para o início da absorção, MRT: tempo de residência médio, MAT: tempo de absorção médio, MTT: tempo de trânsito médio, $T_{m\acute{a}x}$: tempo de ocorrência de $C_{m\acute{a}x}$, $C_{m\acute{a}x}$: concentração plasmática máxima, Cl: clearance total, $V_{d\acute{a}rea}$: volume de distribuição calculado pela ASC, V_c : volume de distribuição central, F_{oral} : biodisponibilidade.

Fonte: do autor (2018).

5.3 Discussão e comparação estatística

Na **figura 16**, estão plotados os perfis farmacocinéticos dos grupos avaliados. A relação de ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} foi superior a 0,8 em todos os grupos, indicando que o planejamento do estudo foi adequado (apêndice 1).

Figura 16 - Perfis farmacocinéticos dos grupos de animais avaliados (média \pm DP, n = 35; n = 7 por grupo).



Fonte: do autor (2018).

Na **tabela 16**, estão apresentados os resultados da análise estatística dos grupos pelo teste de *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*.

Tabela 16 - Parâmetros farmacocinéticos de todos os grupos e comparação estatística (média; CV%, n=35, n=7 por grupo).

Parâmetros	Unidades	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
		I.V. (2,7 mg/kg)	EFV-IFA (50 mg; V.O)	EFV-HDL (50 mg; V.O)	EFV-IFA + TNF/3TC (50 mg, 25mg, 25mg; V.O)	EFV-HDL + TNF/3TC (50 mg, 25mg, 25mg; V.O)
ASC_{0-∞}	µg/mL.min	133,45 (45,84%)	1106,42 ^{A, Z} (61,26%)	379,55 ^Z (44,67%)	784,03 ^{A, Z} (44,99%)	529,53 ^Z (87,72%)
K_{el}	Min ⁻¹	0,0132 (41,36%)	0,0022 ^{A, Z} (67,90%)	0,0032 ^Z (80,54%)	0,0019 ^{A, Z} (33,56%)	0,0028 ^Z (48,17%)
T_{1/2}	Min	60,85 (42,72%)	624,28 ^{A, Z} (94,85%)	339,83 ^Z (64,44%)	398,88 ^{A, Z} (30,62%)	302,27 ^Z (44,91%)
K_a	Min ⁻¹	n.a	0,0037 (73,19%)	0,0098 (83,91%)	0,0049 (77,09%)	0,0040 (44,78%)
T_{1/2 a}	Min	n.a	290,71 (73,90%)	127,37 (80,33%)	189,73 (41,16%)	212,25 (53,98%)
MTT	Min	87,81 (42,72%)	900,84 ^A (94,85%)	812,21 ^A (45,84%)	834,88 ^A (27,53%)	895,39 ^A (33,86%)
MAT	Min	n.a	419,50 (73,90%)	183,79 (80,33%)	273,78 (41,16%)	306,27 (53,98%)
MRT	Min	87,81 (42,72%)	677,18 ^Z (106,33%)	628,42 ^{A, Z} (64,82%)	520,78 ^{A, Z} (29,00%)	589,12 ^{A, Z} (33,48%)
T_{lag}	Min	n.a	0,75 (107,07%)	1,86 (78,75%)	2,56 ^{X, Y} (30,72%)	0,78 (128,46%)
T_{máx}	Min	n.a	370 (29,75%)	411,43 (44,09%)	462,86 (40,80%)	651,43 (49,72%)
C_{máx}	µg/mL	n.a	1,46 (62,68%)	0,84 (58,57%)	0,95 (24,84%)	0,90 (80,68%)
Cl	mL/min/kg	22,64 (28,45%)	29,76 (73,33%)	25,68 (59,53%)	24,26 (44,63%)	38,16 (71,98%)
V_dárea	mL/kg	1791,85 (18,47%)	20517,97 ^{A, Z} (83,94%)	13941,22 ^Z (101,02%)	12723,31 ^{A, Z, W} (32,59%)	15831,55 ^{A, Z} (87,25%)
V_c	mL/kg	1826,89 (18,58%)	16460 ^Z (112,08%)	13529,46 (129,42%)	7890,52 ^Z (34,64%)	17167,27 (204,16%)
F_{oral}	%	n.a	1,34 (59,79%)	0,44 ^X (50,09%)	1 (46,70%)	0,70 (86,70%)

Legenda de parâmetros: K_{el}: constante de eliminação, T_{1/2}: meia-vida de eliminação, K_a: constante de absorção, T_{1/2 a}: meia-vida de absorção, T_{lag}: tempo para o início da absorção, MRT: tempo de residência médio, MAT: tempo de absorção médio, MTT: tempo de trânsito médio, T_{máx}: tempo de ocorrência de C_{máx}, C_{máx}: concentração plasmática máxima, Cl: clearance total, V_dárea: volume de distribuição calculado pela ASC, V_c: volume de distribuição central, F_{oral}: biodisponibilidade. V.O: via oral; n.a: não aplicável. Estatística de *Kruskal-Wallis*: ^A: p<0,05 comparado ao grupo I (intravenoso). Estatística de Mann-Whitney: ^Z: p<0,05 comparado ao grupo I (intravenoso); ^Xp<0,05 comparado ao grupo II (EFV-IFA); ^Y: p<0,05 comparado ao grupo V (EFV-HDL + TNF/3TC); ^W: p<0,05 comparado ao V_c do grupo IV (EFV-IFA+ TNF/3TC).

Fonte: do autor (2018).

5.3.1 Clearance plasmático (Cl)

O clearance plasmático (Cl) indica o volume de plasma do qual o fármaco é completamente eliminado por unidade de tempo pelos processos de metabolismo e excreção (CURRY, 2011). Os principais órgãos eliminadores são fígado e rins, mas também podem incluir outras rotas de eliminação. Fatores fisiológicos influenciam o clearance plasmático: débito cardíaco (DC) e taxa de extração (*E*) (TOUTAIN e BOUSQUETMÉLOU, 2004a).

O débito cardíaco é uma propriedade específica de cada modelo animal e pode ser calculado através da **equação 3**:

(Eq. 3)

$$DC \text{ (mL/min/kg)} = 180 \times \text{massa corporal (kg)}^{-0,19}$$

O débito cardíaco médio dos animais deste estudo foi de 146,09 mL/min/Kg, considerando massa corporal média de 3,0 kg. O valor máximo de Cl será próximo ao valor do débito cardíaco no órgão eliminador. Sabe-se que o fluxo de sangue para fígado e rins é aproximadamente 50% do débito cardíaco (TOUTAIN e BOUSQUETMÉLOU, 2004a), portanto, o valor máximo de Cl é de 73,04 mL/min/Kg.

A taxa de extração (*E*) expressa, em valores numéricos entre 0 e 1, a capacidade intrínseca do órgão eliminador em depurar o fármaco durante uma única passagem (**equação 4**) (TOUTAIN e BOUSQUETMÉLOU, 2004a). Devido ao fato do fluxo de sangue para fígado e rins ser aproximadamente 50% do débito cardíaco, o valor máximo da taxa de extração para esses órgãos é de 0,5.

(Eq. 4)

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

Devido ausência de diferença significativa entre os valores médios de Cl dos grupos I, II, III, IV e V, assumiu-se o valor médio entre eles (28,1 mL/min/kg). O valor médio de Cl de 28,1 mL/min/kg e a taxa de extração de 0,192 são considerados intermediários porque representam uma depuração menor que 73,04 mL/min/kg e taxa de extração menor que 0,5. Semelhantemente, Balani e colaboradores (1998)

relataram valores de CI plasmático baixos em ratos (67 mL/min/kg) e macacos (11,5 mL/min/kg).

5.3.2 Volume de distribuição (Vd)

O volume de distribuição (Vd) é uma medida que relaciona a quantidade de fármaco existente no organismo à sua concentração no plasma. Conceitualmente, se define como o volume no qual o fármaco deve estar contido para que a sua concentração se iguale a do plasma (TOUTAIN e BOUSQUET-MELÓU, 2004c). Este parâmetro pode ser calculado como $Vd_{\text{área}}$ e V_c .

O valor mínimo de Vd para um fármaco corresponde ao próprio volume do plasma, caso não seja distribuído nos elementos figurados do sangue e no espaço extravascular (STORPIRTIS, 2011). Desta forma, para interpretação deste parâmetro é preciso considerar o volume plasmático da espécie em estudo. Para um coelho de massa corpórea de aproximadamente 3 kg, o volume sanguíneo é em torno de 168 mL ou 56 mL/kg.

Os valores de $Vd_{\text{área}}$ dos grupos orais (II, III, IV e V) não foram significativamente diferentes entre si, mas foram diferentes em relação ao grupo intravenoso (I). Para o grupo I, o Vd foi de 1791,85 mL/kg e, para os grupos orais, assumiu-se o valor médio de 14218,20 mL/kg. Essa diferença entre o grupo intravenoso e os grupos orais (II, III, IV e V) ocorreu devido a via de administração e forma farmacêutica diferentes. Em todos os casos, o valor de Vd foi muito superior ao volume sanguíneo, o que indica acúmulo extravascular. Os valores de V_c dos grupos orais (II, III, IV e V) não foram significativamente diferentes entre si, mas os grupos II e IV foram diferentes em relação ao grupo intravenoso (I).

Balani e colaboradores (1998) relataram Vd de 5500 mL/kg e 3800 mL/kg após administração intravenosa de 5 mg/kg em ratos e macacos, respectivamente, sendo maiores que o volume sanguíneo das espécies. O acúmulo extravascular é coerente com alta lipofilicidade de EFV.

5.3.3 Meia-vida de eliminação ($T_{1/2}$) e constante de eliminação (K_{el})

A meia-vida de eliminação ($T_{1/2}$) é o parâmetro farmacocinético mais frequentemente relatado e indica o tempo necessário para que a concentração

plasmática diminua pela metade após atingir o equilíbrio de distribuição. (TOUTAIN e BOUSQUET-MELÓU, 2004b). Sua principal utilidade clínica é na seleção do intervalo de dose apropriado em um regime posológico, já que a relação entre $t_{1/2}$ e intervalo de dose determina a amplitude das flutuações das concentrações do fármaco no plasma (TOUTAIN e BOUSQUET-MELÓU, 2004b).

O valor de $T_{1/2}$ do grupo intravenoso (I) foi de 60,85 min, sendo considerada uma $T_{1/2}$ curta. Os valores de $T_{1/2}$ dos grupos orais (II, III, IV e V) não apresentaram diferença estatística significativa entre si, portanto assumiu-se o valor médio de $T_{1/2}$ de 416,31 min (6,94 h), um valor considerado intermediário. Esses valores estão próximos ao publicados por Balani e colaboradores (1998), que obteve uma $T_{1/2}$ média de 67,8 min (1,13 h) quando administrado pela via intravenosa em ratos; Gaur e colaboradores (2014) obtiveram um valor de 495 min (8,25 h) em ratos pela via oral.

A meia-vida de eliminação depende do Vd e do Cl como está demonstrado na **equação 5:**

(Eq. 5)

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2 \times Vd}{Cl}$$

Entretanto, Cl e $T_{1/2}$ não transmitem a mesma informação sobre a eliminação de fármacos. Por exemplo, $T_{1/2}$ diferentes podem ser observadas para fármacos que possuem o mesmo Cl (TOUTAIN e BOUSQUET-MELÓU, 2004a). Isto ocorre porque o Vd tem impacto direto sobre a $T_{1/2}$ e, conseqüentemente, na duração de sua ação: quanto maior o Vd, maior a $T_{1/2}$ (TOUTAIN e BOUSQUET-MELÓU, 2004c). Este caráter híbrido torna a $t_{1/2}$ um parâmetro fraco e pouco robusto, não sendo apropriado para avaliar influência de fatores fisiológicos ou patológicos (insuficiência renal e hepática) na disposição do fármaco (TOUTAIN e BOUSQUET-MELÓU, 2004b). Como dito anteriormente, os valores de Cl foram estatisticamente iguais em todos os grupos, porém os valores de $Vd_{\text{área}}$ dos grupos II, III, IV e V foram diferentes em relação ao grupo I e isto proporcionou valores de $T_{1/2}$ diferentes nos grupos II, III, IV e V também.

A constante de eliminação (K_{el}) corresponde a inclinação da reta terminal e caracteriza a velocidade de eliminação do fármaco, expressando a eficiência de

eliminação por unidade de tempo (TOUTAIN e BOUSQUET-MELÓU, 2004b). Este parâmetro possui relação direta com a $t_{1/2}$, sendo obtido pela **equação 6**:

(Eq. 6)

$$k_{el} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

As constantes de eliminação dos grupos orais (II, III, IV e V) não foram significativamente diferentes entre si, assumindo um valor médio de K_{el} de $0,0025 \text{ min}^{-1}$. Entretanto, os grupos orais foram diferentes em relação ao grupo intravenoso (I), que teve um K_{el} de $0,0132 \text{ min}^{-1}$. Isso significa que 0,25% e 1,32% de EFV foi eliminado por minuto durante a fase de eliminação nos grupos orais e intravenoso, respectivamente.

5.3.4 Tempo de residência médio (MRT), tempo de trânsito médio (MTT), tempo de absorção médio (MAT) e tempo para início da absorção (T_{lag}).

O tempo de residência médio (MRT) é o parâmetro que estima o tempo que as moléculas do fármaco residem no organismo após ser completamente absorvido e antes de ser eliminado (TOUTAIN e BOUSQUET-MELÓU, 2004d). A distribuição e eliminação do fármaco deve ser precedida pela sua dissolução e absorção. O tempo médio que fármaco transita no organismo desde o início de sua absorção até sua completa eliminação é chamado de tempo de trânsito médio (MTT). Na administração intravascular, o MRT é igual ao MTT. Porém, na administração extravascular, o MTT é a soma de MRT com o tempo médio de absorção (MAT) (BONATE et al., 2004). O MAT é tempo médio para que um fármaco seja absorvido e pode ser conceitualmente definido pela **equação 7**:

(Eq. 7)

$$MAT = MRT_{ev} - MRT_{iv}$$

Os valores de MRT dos grupos orais (II, III, IV e V) não foram estatisticamente diferentes entre si, desta forma assumiu-se o valor médio de 603,88 minutos. Este valor foi significativamente diferente em relação ao grupo intravenoso (I) que

apresentou MRT de 87,81 minutos. Essa diferença demonstra que a fase de absorção é limitada pela baixa solubilidade de EFV, influenciando os processos de distribuição e eliminação (TOUTAIN e BOUSQUET-MELOU, 2004d). Esses resultados estão próximos ao publicados por Gaur e colaboradores (2014) que obtiveram um valor médio de MRT de 714 minutos em ratos pela via oral na forma de suspensão.

A comparação estatística dos valores de MAT não revelou nenhuma diferença significativa, indicando que o perfil de absorção foi semelhante em todos os grupos. Com relação ao MTT, os valores dos grupos orais (II, III, IV e V) foram estatisticamente iguais entre si, porém foram diferentes do grupo intravenoso (I). Isto é esperado, pois além dos processos de distribuição e eliminação, também ocorre o processo de absorção na via extravascular, fazendo com que aumente o MRT.

Outro parâmetro avaliado foi o tempo para início da absorção (T_{lag}). Numa administração oral, o fármaco não é imediatamente absorvido para o sangue, mas sim após um certo tempo devido aos processos de desintegração e dissolução do ativo que ocorrem antes do início da absorção propriamente dita (BRETT et al., 2003). Diferenças estatísticas foram observadas no valor de T_{lag} do grupo IV (EFV-IFA + TNF/3TC) em relação ao grupo II (EFV-IFA) e V (EFV-HDL + TNF/3TC). Todavia, essas diferenças não são clinicamente relevantes visto a pequena magnitude da alteração, que não passam de 5 minutos de atraso.

5.3.5 Concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e tempo para atingir $C_{máx}$ ($T_{máx}$)

A concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) é um parâmetro farmacocinético que indica a exposição máxima do organismo ao fármaco e se relaciona com a intensidade dos efeitos farmacológicos ou toxicológicos (JANG, 2001). A $C_{máx}$ é uma variável influenciada pela dose administrada e pelas constantes de absorção e eliminação. A $C_{máx}$ é atingida quando a velocidade de absorção e de eliminação se igualam e $T_{máx}$ é o tempo necessário para que este equilíbrio seja atingido (TOUTAIN e BOUSQUET-MELOU, 2004d).

Os valores médios de $C_{máx}$ dos grupos orais (II, III, IV e V) não apresentaram diferença estatística, sendo assim, assumiu-se o valor médio de 1,04 $\mu\text{g/mL}$. O resultado foi semelhante ao encontrado no estudo de Gaur e colaboradores (2014),

que obteve um valor de $C_{m\acute{a}x}$ de $0,791 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$ após administração de 10 mg de EFV em ratos. Os valores de $T_{m\acute{a}x}$ dos grupos II, III, IV e V não apresentaram diferença estatística também.

5.3.6 Avaliação da biodisponibilidade absoluta (F_{oral})

A biodisponibilidade é o parâmetro farmacocinético que descreve a proporção de fármaco absorvida e disponibilizada para a circulação sistêmica quando administrado por vias extravasculares (TOUTAIN e BOUSQUET-MELÓU, 2004d). A biodisponibilidade é uma propriedade inerente do produto farmacêutico e pode haver diferenças entre formulações contendo um mesmo fármaco para a mesma via de administração, resultando em diferenças na efetividade terapêutica dos produtos (SHARGEL, 2016).

A biodisponibilidade pode ser descrita como biodisponibilidade absoluta (F_{oral}) que é a porcentagem da dose administrada que realmente atinge a circulação sistêmica e varia de 0 a 100%. Sabe-se que quantidade total de fármaco que atinge circulação sistêmica é diretamente proporcional à ASC, desta forma F_{oral} é determinada comparando a respectivas ASCs do produto de teste e do produto administrado pela via intravenosa, em que se assume ser 100% disponível (CHERESON, 1996; TOUTAIN e BOUSQUET-MELÓU, 2004d). Desta forma, foram utilizados os valores de área sob a curva extrapolada ao infinito ($ASC_{0-\infty}$) e as doses corrigidas pelo peso ($\mu\text{g/kg}$) para os cálculos desse parâmetro, aplicando a **equação 8**:

(Eq. 8)

$$F = \frac{ASC_{0-\infty}(\text{oral}) \times \text{dose}(\text{iv})}{ASC_{0-\infty}(\text{iv}) \times \text{dose}(\text{oral})}$$

Balani e colaboradores (1998), relatam F_{oral} de 16% em ratos e 42% em macacos. Neste trabalho, os valores de F_{oral} encontrados para os grupos orais (II, III, IV e V) foram 134%, 44%, 100% e 70%, respectivamente, e não foram diferentes estatisticamente entre si, apesar da alta variabilidade entre grupos. Os altos valores de F_{oral} podem estar relacionados ao maior volume de fluido biliar secretado pelos coelhos. Kararli e colaboradores (1995) apontam as diferenças da secreção biliar entre modelos animais e demonstram maior fluxo em coelhos ($130 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) do que

em ratos (48-92 mL.d⁻¹.kg⁻¹) e macacos (19-32 mL.d⁻¹.kg⁻¹). A bile é importante na absorção de compostos lipofílicos devido a melhora da taxa de dissolução e de solubilidade (KARARLI, 1995). Além disso, fármacos que sofrem excreção biliar, como o EFV, podem ser reabsorvidos através da circulação enterohepática (CHO, 2011).

6 Considerações Finais

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Processo nº 2015/23843-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

6.1 Conclusão

O método bioanalítico desenvolvido apresentou limites de confiança adequados para a quantificação de EFV em plasma, podendo ser aplicado nos estudos em farmacocinética.

Diferente dos estudos *in vitro* de Fontes et al (2016), que apontam um incremento de 558% na solubilidade do EFV-HDL em relação ao EFV-IFA, a análise farmacocinética, não apontou diferenças significativas entre os parâmetros do EFV quando administrados com ou sem HDL, sugerindo que não há vantagens na utilização do sistema para a veiculação deste ativo neste modelo animal.

A biodisponibilidade oral do EFV para o modelo animal foi elevada (100%) e acredita-se que isto ocorreu devido ao fato do modelo animal apresentar abundante secreção biliar, minimizando os problemas de solubilidade do EFV e impedindo a observação de possíveis benefícios do HDL na solubilidade do ativo.

6.2 Perspectivas

Prosseguir a avaliação em outro modelo animal, como o macaco, que possui similaridade de secreção biliar com o homem e pode evidenciar os benefícios para continuidade do desenvolvimento do produto.

REFERÊNCIAS

- AHMED, M.A.; BRICK, A. A.; MOHAMED, A. A. An efficient adsorption of indigo carmine dye from aqueous solution on mesoporous Mg/Fe layered double hydroxide nanoparticles prepared by controlled sol-gel route. **Chemosphere**, v.174, pg. 280-288, 2017.
- ALEXANDER, T. S. Human Immunodeficiency Virus Diagnostic Testing: 30 Years of Evolution. **Clinical and Vaccine Immunology**, vol. 23, pg. 249 –253, USA, 2016.
- ALI, S. H.; AL-QUBAISI, M.; HUSSEIN, M. Z.; ISMAIL, M.; ZAINAL, Z.; HAKIM, M. N. In Vitro Inhibition of Histamine Release Behavior of Cetirizine Intercalated in to Zn/Al- and Mg/Al-Layered Double Hydroxides. **International Journal of Molecular Science**, v.13, n.5, p. 5899-5916, 2012.
- ALMOND, L. M.; HOGGARD, P. G.; EDIRISINGHE, D.; KHOO, S. H.; BACK, D. J. Intracellular and plasma pharmacokinetics of efavirenz in HIV-infected individuals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 56, pg. 738–744, 2005.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; DE OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2006.
- ANDREA, K. A.; WANG, L., CARRIER, A. J. Adsorption of Oligo-DNA on Magnesium Aluminum-Layered Double-Hydroxide Nanoparticle Surfaces: Mechanistic Implication in Gene Delivery. **Langmuir**, v.33, n.16, p. 3926–393, 2017.
- APOSTOLOVA, N.; BLAS-GARCIA, A.; GALINDO, M. J.; & ESPLUGUES, J. V. Efavirenz: What is known about the cellular mechanisms responsible for its adverse effects. **European journal of pharmacology**, v. 812, p. 163-173, 2017.
- AVACHAT, A. M.; PARPANI, S. S. Formulation and development of bicontinuous nanostructured liquid crystalline particles of efavirenz. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 126, p. 87-97, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776514006900>>. Acessado em: 17/11/2015.
- AZEREDO, F. J.; UCHÔA, F. D. T.; COSTA, T. D. P-glycoprotein role on drug pharmacokinetics and interactions. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n.4, p. 321-326, 2009.
- BALANI, S. K.; KAUFFMAN, L. R.; DELUNA, 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, 1998.

Disponível em: <<http://dmd.aspetjournals.org/content/27/1/41.full.pdf+html>>. Acessado em: 17/11/2015

BAO, W.; WANG, J.; WANG, Q.; O'HARE, D.; WAN, Y. Layered Double Hydroxide Nanotransporter for Molecule Delivery to Intact Plant Cells. **Scientific Reports**, v.6 26738, 2016.

BARON, S. Human Retroviruses. **Medical Microbiology**, 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas, 1996. Chapter 62.

BARRÉ-SINOUSSE, F.; ROSS, A. L.; DELFRAISSY, J. F. Past, present and future: 30 years of HIV research. **Microbiology, Nature Reviews**, v. 11, p.877-883, 2013.

BARTLETTA, J. A.; FATHB, M. J.; DEMASIC, R.; HERMESB, A.; QUINND, J.; MONDOUD, E.; ROUSSEAUD, F. An updated systematic overview of triple combination therapy in antiretroviral-naive HIV-infected adults. **AIDS**, v. 20, p. 2051–2064, 2006.

BENEDETTI, M. S. et al. Drug metabolism and pharmacokinetics. **Drug Metabolism Reviews**, v. 41, n. 3, p. 344-390, 2009.

BÉTHUNE, 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.

BONATE, P. L.; HOWARD, D. R. **Pharmacokinetic in drug development: clinical study design and analysis**. 2004.

BOROUJERDI, M. Non compartmental approach in pharmacokinetics based on statistical moments. In: **Pharmacokinetics: principles and applications**. New York: Mc Graw-Hill, 2002, p.331-341.

BOROUJERDI, M. **Pharmacokinetics: principles and applications**. McGrawHill, Indianapolis/Cambridge: Hackett Publishing Company, 1995.

BOUR, S.; GELEZIUNAS, R.; WAINBERG, M. A. The human immunodeficiency virus type 1 (hiv-1) cd4 receptor and its central role in promotion of hiv-1 infection. **Microbiological reviews**, v. 59, p. 63–93, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde, Programa DST/AIDS. “Brasil renova licenciamento compulsório do Efavirenz”, 2012. Disponível em:< http://www.aids.gov.br/noticia/2012/brasil_renova_licenciamento_compulsorio_do_efavirenz>. Acessado em: 20/10/2015.

BRASIL. Ministério da Saúde, Programa DST/AIDS. “Formas de contágio”. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/formas-de-contagio>>. Acessado em: 17/10/2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde, Programa DST/AIDS. “O que é AIDS”. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/o-que-e-aids>>. Acessado em: 17/10/2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 27 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV, 2013. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_diagnostico_infeccao_hiv.pdf>. Acessado em: 16/05/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília, 2015c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico: Aids e DST. Brasília, 2016.

BRETT, M.; WEIMANN, H. J.; CAWELLO, W.; ZIMMERMANN, H. et al. **Parameters for compartment-free pharmacokinetics: standardization of study design, data analysis and reporting.** Shaker Verlag. Germany. 2003.

CANADIAN COUNCIL OF ANIMAL CARE (CCAC). **Guide to the Care and Use of Experimental Animals.** Ottawa: Canadian Council on Animal Care, v. 2, 1984.

CASTRO K. A. D. F., WYPYCH F., ANTONANGELO A., MANTOVANI K. M., BAIL A., ET AL. Selective oxidation catalysts obtained by immobilization of iron (III) porphyrins on thiosalicylic acid-modified Mg-Al layered double hydroxides. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 478, p. 374–383, 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection: Updated Recommendations, 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hiv/pdf/hivtestingalgorithmrecommendation-final.pdf>>. Acessado em: 16/05/2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). About HIV/AIDS. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>>. Acessado em: 17/10/2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. HIV transmission, 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hiv/basics/transmission.html>>. Acessado em: 14/05/2016

CHERESON, R. Bioavailability, Bioequivalence, and Drug Selection. Em: Makoid, M C; Vuchetich, P J; Banakar, U V. **Basic Pharmacokinetics**, 1996.

CHO, D. Y.; OGBURN, E. T.; JONES, D.; DESTA, Z. Contribution of n-glucuronidation to efavirenz elimination in vivo in the basal and rifampin-induced metabolism of efavirenz. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p.1504–1509, 2011.

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

CHOWDARY, K. P. R.; ANNAMMA, D. G. S. Preclinical pharmacokinetic evaluation of efavirenz-cyclodextrin – pvp inclusion complexes. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.15, n. 1, p. 23-26, 2012.

CHOY, J. H., KWAK, S. Y., JEONG, Y. J. et al. Inorganic Layered Double Hydroxides as Nonviral vectors. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, n. 22, 2000.

CREPALDI, E. L.; VALIM, J. B. Hidróxidos duplos lamelares: síntese, estrutura, propriedades e aplicações. **Química nova**, v. 21, n. 3, 1998.

CRISTOFOLETTI, R.; NAIR, A.; ABRAHAMSSON, B.; GROOT, D. W.; KOPP, S.; LANGGUTH, P.; POLLI, J.E.; SHAH, V.P.; DRESSMAN, J.P. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Efavirenz. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 102, n. 2, 2013.

CUNHA, V. R. R.; FERREIRA, A. M. C.; CONSTANTINO, V. R. L. et al. Hidróxidos duplos lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p.159-171, 2010.

CUTLER, D. J. Theory of the mean absorption time, an adjunct to conventional bioavailability studies. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 476-478, 1978.

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

DE CLERCQ, E. Antiviral Therapy for Human Immunodeficiency Virus Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 200–239, 1995.

DE ZWART, L. L. et al. Anatomical and physiological differences between various species used in studies on the pharmacokinetics and toxicology of xenobiotics. A review of literature. **RIVM Rapport 623860010**, 1999.

DELLAMONICA, P.; PERRI, G. D.; GARRAFFO, R. NNRTIs: Pharmacological data. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 42, p. 287–295, 2012.

DHILLON, S.; GILL, K. Basic pharmacokinetic. In: **Clinical Pharmacokinetic**. 1th edition, 2006.

DIEHL, K. H. *et al.* 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: drug&drugtargetting database, 2015. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/drugs/db00625#properties>>. EMA. European Medicines Agency. Summary of product characteristics - Efavirenz, 2012.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Scientific Discussion about Sustiva. Março, 2004. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000249/WC500058308.pdf>. Acessado em: 20/10/15.

FAN, J.; LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**, 87, p. 93–120, 2014.

FAUCI, A. S.; MARSTON, H. D.; FOLKERS, G. K. An HIV Cure: Feasibility, Discovery, and Implementation. **Journal of American Medical Association**, v. 312, n. 4, 2014.

FEARON, M. The laboratory diagnosis of HIV infections. **Canadian Journal of Infectious Diseases Medical Microbiology**, v. 16, p. 26-30, 2005.

FERREIRA, R. C. S.; RIFFEL, A.; SANT'ANA, A. E. G. HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1743-1755, 2010.

FISCHL, M. A.; RICHMAN, D. D., GRIECO, M. H., GOTTLIEB, M. S., *et al.* The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex: A double-blind, placebo-controlled trial. **The New England Journal of Medicine**, v. 317, p.185–191, 1987.

FONTES, D. A. F.; LYRA, M. A. M.; ANDRADE, J. K. F.; SCHVER, G. C. R. M.; CaAl-layered double hydroxide as a drug delivery system: effects on solubility and toxicity of the antiretroviral efavirenz. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 2016.

FREED, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation. **Nature Reviews**, v.13, 2015.

FREED, E. O. HIV-1 Replication. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, v.26, 2001.

GALVAO, J.; DAVIS, D.; TILLEY, M.; NORMANDO, E.; DUCHEN, M. R.; CORDEIRO, M. F. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**, v. 28, n.3, p.1317-30, 2014.

GAO, X.; CHEN, L.; XIE, J.; YIN, Y.; CHANG, T.; DUAN, Y.; JIANG, N. In vitro controlled release of vitamin C from Ca/Al layered double hydroxide drug delivery system. **Materials Science and Engineering: C**, v. 39, p. 56-60, 2014.

GAUR, P. K.; MISHRA, S.; BAJPAI, M.; MISHRA, A. Enhanced Oral Bioavailability of Efavirenz by Solid Lipid Nanoparticles: *In Vitro* Drug Release and Pharmacokinetics Studies. **BioMed Research International**, 2014.

GRILO, N. M.; CORREIA, M. J.; MIRANDA, J. P.; CIPRIANO, M.; SERPA, J.; MARQUES, M. M et al. Unmasking efavirenz neurotoxicity: Time matters to the underlying mechanisms. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.105, p.47-54, 2017.

Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, Draft Guidance. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). p.34, 2013.

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

GULICK, R. M.; RIBAUDO, H. J.; SHIKUMA, C. M.; LALAMA, C.; et al. Three- vs four-drug antiretroviral regimens for the initial treatment of HIV-1 infection: a randomized controlled trial. **The Journal of American Association**, 2006. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=203172>>. Acessado em: 19/10/2015.

HAMMER, S.; CRUMPACKER, C.; D'AQUILA, R.; JACKSON, B.; LATHEY, J.; LIVNAT, D.; REICHELDERFER, P. Use of Virologic Assays for Detection of Human Immunodeficiency Virus in Clinical Trials: Recommendations of the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee. **Journal of Clinical Microbiology**, 1993.

HART, C.; SPIRA, T.; MOORE, J.; SNINSKY, J.; SCHOCHETMAN, G.; LIFSON, A.; GALPHIN, J.; OU, C. Y. Direct detection of HIV RNA expression in seropositive subjects. **The Lancet**, 1988.

IWEALA, O. I. HIV diagnostic tests: an overview. **Contraception**, v. 70, p. 141-147, 2004.

JANG, G. R.; HARRIS, R. Z.; LAU, D. T. Pharmacokinetics and its role in small molecule drug discovery. **Medicinal Research Reviews**, v. 21, n. 5, p. 382-396, 2001.

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.

KASIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNAS, H.; HUSSAIN, A. S.; JUNGINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S. A.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, n.1, p. 85-96, 2003.

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

KOROLEV, S. P.; AGAPKINA Y. Y.; GOTTIKH, M.B. Clinical Use of Inhibitors of HIV-1 Integration: Problems and Prospects. **ACTA NATURAE**, v.3, n. 3, 2011.

KOTTA, S.; KHAN, W. A.; ANSARI, S.H.; SHARMA, R. K.; ALI, J. Anti-HIV nanoemulsion formulation: Optimization and *in vitro*–*in vivo* evaluation.

International Journal of Pharmaceutics, v. 462, 2014. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517313011149>>.

Acessado em: 17/11/2015.

LENNETTE, E. T.; KARPATKIN, S.; LEVY, J. A. Indirect Immunofluorescence Assay for Antibodies to Human Immunodeficiency Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 199-202, 1987.

MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. **The Lancet**, v. 384, p. 258-271, 2014.

MAHMOOD, T.; YANG, P. C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 9, p. 429-434, 2012.

MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G. M. M.; KANTER, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 2, n. 6, p. 875-894, 2006.

MARZOLINI C.; TELENTI, A.; DECOSTERD, L. A.; GREUB, G.; BIOLLAZ, J.; BUCLIN, T. Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. **AIDS**, v.15, p. 71-75, 2001.

MICROMEDEX. Micromedex Healthcare Series Date Base, 2015. Disponível em:<http://www.micromedexsolutions.com/micromedex2/librarian/PFDefaultAction/d/evidencexpert.DoIntegratedSearch#>

NEERVANAN, S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 2, n. 5, p. 715-731, 2006.

NOBEL LAUREATES. The Nobel Prize in Physiology or Medicine, 2008. Disponível em: < http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/nobelguide_med.pdf>. Acessado em: 12/05/16

PALELLA, F. J.; DELANEY, K. M.; MOORMAN, A. C.; LOVELESS, M. O.; FUHRER, J.; SATTEN, G. A.; ASCHMAN, D. J.; HOLMBERG, S. D. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, 1998.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; DI NAUTA, L.; NOCCHETTI, M.; ROSSI, C. Effects of hydrotalcite-like nanostructured compounds on biopharmaceutical properties and release of BCS class II drugs: The case of flurbiprofen. **Applied Clay Science**, v 51, p. 407–413, 2011.

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, Springer, p. 19-81, 2014.

PRASAD B. E., DINAMANI M., KAMATH P. V., MEHTA S.H. Hexacyanoferrate (III) as an electroactive probe for the investigation of the interlayer basicity of the layered double hydroxide (LDH) of Mg with Al. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 348, p. 216–218, 2010.

PUBCHEM. The PubChem Project. USA: National Center for Biotechnology Information, 2016.

RABEL, S. R.; MAURIN, M. B.; ROWE, S. M.; HUSSAIN, M. Determination of the pK, and pH-Solubility Behavior of an Ionizable Cyclic Carbamate, (S) -6-Chloro-4-(cyclopropylethynyl)-1,4-dihydro-4-(trifluoromethyl)-2H-3,1-benzoxazin-2-one (DMP 266). **Pharmaceutical Development and Technology**, v.1, p. 91-95, 1996.

RADESCA, L. A.; 203 Cheltenham Road, Newark, DE 19711 (US); MAURIN, M. B.; 28 Country Gates Road; Wilmington, DE 19810 (US); RABEL, S. R.; 431 Buttonwood Drive, Landerberg, PA 19350 (US); MOORE, J. R.; 39 Flinthill Drive, Newark, DE 19702 (US). **Crystalline efavirenz**. C07D265/18, A61K 31/535. PCT/US99/13/13199. WO1999064405 A1. 10 jun. 1999. 16 dez. 1999.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Rang & Dale's pharmacology**. 7th. Edinburg; New York: Elsevier/Churchill Livingstone, 2016.

RAY, S.; SAHA, S.; SA, B. et al. In vivo pharmacological evaluation and efficacy study of methotrexate-encapsulated polymer-coated layered double hydroxide

nanoparticles for possible application in the treatment of osteosarcoma. **Drug Deliv. and Transl. Res.**, v. 7, p. 259–275, 2017.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **International Scholarly Research Network Pharmaceuticals**, 2012.

SENAPATIA, P. C.; SAHOOB, S. K., SAHU, A. N. Mixed surfactant based (SNEDDS) self-nanoemulsifying drug delivery system presenting efavirenz for enhancement of oral bioavailability. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 80, p. 42–51, 2016.

SHARGEL, L; YU, A B C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**, 7^a edição, 2016.

SHIMADA, M.; HOSAKA, H.; TAKAKU, H.; SMITH, J. S.; ROTH, M. J.; INOUE, S.; INOUE, M.; Specificity of Priming Reaction of HIV-1 Reverse Transcriptase, 2'-OH or 3'-OH*. **Journal of Biological Chemistry**. 1994.

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

TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, M. Host-Guest Interaction swelling clay minerals and poorly water-soluble drugs. 1: Complex formation between a swelling clay mineral and griseofulvin. **Journal of Inclusion Phenomena and Molecular recognition in Chemistry**, v.10, p.283-297, 1991.

TAKANO, R.; SUGANO, K.; HIGASHIDA, A.; HAYASHI, Y.; MACHIDA, M.; ASO, Y.; YAMASHITA, S. Oral Absorption of Poorly Water-Soluble Drugs: Computer Simulation of Fraction Absorbed in Humans from a Miniscale Dissolution Test. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 6, 2006.

TOUTAIN, P. L., BOUSQUET-MELOU, A. Plasma Clearance. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 415-25, 2004a.

TOUTAIN, P. L., BOUSQUET-MELOU, A. Plasma terminal half-life. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 427-39, 2004b.

TOUTAIN, P. L., BOUSQUET-MELOU, A. Volumes of distribution. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 441-53, 2004c.

TOUTAIN, P. L.; BOUESQUET-MÉLOU, A. Bioavailability and its assessment. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 455-466, 2004d.

TOZER, T. N.; ROWLAND M. **Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**: the quantitative basis of drug therapy, 1^a edition. Artemed, Porto Alegre, 2009.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection, 2016. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ForPatients/Illness/HIVAIDS/Treatment/ucm118915.htm>>. Acessado em: 25/05/16.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US FDA). Sustiva label. 2005. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/020972s026021360s013lbl.pdf>. Acessado em: 20/10/15.

UNITED STATES OF AMERICA (USA). Department of Health & Human Services. AIDS.gov. The Stages of HIV Infection. Disponível em: <<https://www.aids.gov/hiv-aids-basics/just-diagnosed-with-hiv-aids/hiv-in-your-body/stages-of-hiv/>>. Acessado em: 13/05/2016.

VIEIRA, A. C. C. Obtenção e caracterização de complexo de inclusão e sistema multicomponentes no incremento da solubilidade do efavirenz na terapia anti-HIV. Dissertação – UFPE, Recife, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). HIV/AIDS. Disponível em: <<http://www.who.int/features/qa/71/en/>>. Acessado em: 17/10/2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). International pharmacopoeia monograph on efavirenz, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus, 2013. Disponível: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85343/7/9789241505840_por.pdf>. Acessado em: 16/05/2016.

XU, T.; ZHANG, J.; CHI, H., CAO, F. Multifunctional properties of organic-inorganic hybrid nanocomposites based on chitosan derivatives and layered double hydroxides for ocular drug delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 36, p.152–163, 2016.

YADOLLAHI, M.; NAMAZI, H.; AGHAZADEH, M. Antibacterial carboxymethyl cellulose/Ag nanocomposite hydrogels cross-linked with layered double hydroxides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 269–277, 2015.

YIN, K.; MENG, X.; DONG, P.; DING, T.; SHEN, L.; ZHANG, L.; ZHANG, R.; CAI, W.; LU, H. A simple, rapid, economical, and practical method for the determination of efavirenz in plasma of Chinese AIDS patients by reverse phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detector. **BioScience Trends**. 2014.

YOUNG, S. D.; BRITCHER, S. F.; TRAN, L. O.; PAYNE, L. S. et al. L-743,726 (DMP-266): a Novel, Highly Potent Nonnucleoside Inhibitor of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n.12, p. 2602–2605, 1995.

ZHANGA, D.; LUO, G.; DING, X.; LU, C. Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 6, p. 549-561, 2012.

ZUBER, R.; ANZENBACHEROVA, E.; ANZENBACHER, P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 6, n. 2, p. 189-198, 2002.

APÊNCIDE A - Resultados individuais do grupo I (administração intravenosa de 2,7 mg/kg de EFV)

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7		
Dose I.V. = 2,7mg/Kg									
Peso (kg)	2,79	2,74	2,69	2,55	2,91	2,75	3,21		
Dose I.V.	7,533	7,398	7,263	6,885	7,857	7,425	8,667		
Parâmetros	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Média	Desvio Padrão
K_{el} (min^{-1})	0,0226	0,0114	0,0062	0,0183	0,0106	0,0116	0,0116	0,013186	0,005454181
$T_{1/2}$ (min)	30,66371681	60,78947368	111,7741935	37,86885246	65,37735849	59,74137931	59,74137931	60,85091	25,99864431
ASC 0-t (ug/mL.min)	95,6388876	103,5872901	236,3856126	82,39600002	118,9724905	105,8987202	103,3552123	120,8906	52,11191656
ASC 0-inf (ug/mL.min)	103,0543512	115,2808241	268,6921608	87,08185527	131,4174762	117,5104207	111,0905856	133,4468	61,17271452
R áreas	0,928043178	0,898564796	0,879763711	0,946190223	0,905301897	0,901185781	0,930368777	0,912774	0,022880369
Cl (mL/min/kg)	26,19976709	23,42106782	10,04867426	31,00531094	20,54521269	22,97668568	24,30448975	22,64303	6,443004899
Vd (mL/kg)	1159,28173	2054,479634	1620,753913	1694,279286	1938,227612	1980,748766	2095,214634	1791,855	330,9204602
MRT (min)	44,24778761	87,71929825	161,2903226	54,64480874	94,33962264	86,20689655	86,20689655	87,80795	37,51608126
ASMC_{0-t} (ug/mL.min)	3140,384497	6561,228547	27257,35952	3520,877105	8310,693195	6431,247553	6896,590317	8874,054	8316,866332
ASMC_{0-inf} (ug/mL.min)	4358,35799	10393,42529	44098,45049	4620,388714	12471,54503	10219,06433	9419,922435	13654,45	13763,69258
Vc (mL/kg)	1179,29679	2102,639981	1630,237894	1754,271977	1947,209	2052,295531	2122,307813	1826,894	339,5871134

Legenda de parâmetros: K_{el} : constante de eliminação, $T_{1/2}$: meia-vida de eliminação, K_a : constante de absorção, $T_{1/2 a}$: meia-vida de absorção, T_{lag} : tempo para o início da absorção, MRT: tempo de residência médio, MAT: tempo de absorção médio, MTT: tempo de trânsito médio, $T_{máx}$: tempo de ocorrência de $C_{máx}$, $C_{máx}$: concentração plasmática máxima, Cl: clearance total, V_d área: volume de distribuição calculado pela ASC, VC: volume de distribuição central, Foral: biodisponibilidade. V.O: via oral; n.a: não aplicável. Fonte: do autor.

APÊNCIDE B - Resultados individuais do grupo II (administração oral de 50 mg de EFV-IFA)

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 5	Animal 6	Animal 7		
Dose (µg/Kg)	14534,88372	16025,64103	15832,80557	15673,98119	16286,64495	16835,01684		
Peso (kg)	3,44	3,12	3,158	3,19	3,07	2,97		
Parâmetros	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Média	Desvio Padrão
K_{el} (min⁻¹)	0,0022	0,0043	0,0005	0,003	0,0026	0,0005	0,002183333	0,001482453
T_{1/2} (min)	315	161,1627907	1386	231	266,5384615	1386	624,283542	592,1510874
ASC_{0-t} (ug/ml.min)	280,7952185	425,1819145	432,615	1479,407278	1173,797222	953,1150039	790,8186061	483,5888686
ASC_{0-inf} (ug/ml.min)	305,6257332	433,3596277	910,615	1594,026517	1359,729224	2035,169895	1106,420999	677,808729
R áreas	0,918755157	0,981129499	0,475080028	0,928094522	0,863258067	0,468322083	0,772439893	0,235943359
Cl (mL/min/kg)	63,72743546	49,55320616	24,94123686	13,17615145	16,05033109	11,08454022	29,75548354	21,81985284
Vd (mL/kg)	28967,01612	11524,00143	49882,47373	4392,050483	6173,204266	22169,08045	20517,97108	17222,63441
MTT (min)	454,5454545	232,5581395	2000	333,3333333	384,6153846	2000	900,842052	854,4748736
ASMC 0-t (ug/mL.min)	201033,224	129831,8175	296532,6	645192,9234	612562,5791	664527,3169	424946,7435	242828,0086
ASMC 0-inf (ug/mL.min)	248075,7627	140565,5415	1940852,6	807188,114	884881,4496	4386796,142	1401393,268	1596454,743
F	0,415997393	0,534989541	1,062916292	2,012002299	1,651707174	2,391659597	1,344878716	0,804138245
K_a (min⁻¹)	0,0027	0,0085	0,0049	0,0027	0,0022	0,0010	0,003666667	0,002683778
t_{1/2} absorção (min)	256,6666667	81,52941176	141,4285714	256,6666667	315	693	290,7152194	214,842551
MAT (min)	370,3703704	117,6470588	204,0816327	370,3703704	454,5454545	1000	419,5024811	310,0181111
T_{máx} (min)	480	180	360	360	480	360	370	110,0908716
C_{máx} (ug/ml)	0,612299692	1,717545006	0,488	2,763950049	2,178857668	0,983952556	1,457434162	0,913600896
MRT (min)	441,3275195	206,7152779	1927,282995	136,0127454	196,2322401	1155,493825	677,1774338	720,0941334
T_{lag} (min)	0,635747742	0,335442907	2,217736624	0,118287864	0,138576458	1,030596562	0,746064693	0,79883696
Vc (mL/kg)	12385,43068	6741,283621	50590,46007	2485,7959	3024,489005	23532,69094	16460,02504	18448,62142

Legenda de parâmetros: kel: constante de eliminação, t_{1/2}: meia-vida de eliminação, ka: constante de absorção, t_{1/2} a: meia-vida de absorção, T_{lag}: tempo para o início da absorção, MRT: tempo de residência médio, MAT: tempo de absorção médio, MTT: tempo de trânsito médio, T_{máx}: tempo de ocorrência de C_{máx}, C_{máx}: concentração plasmática máxima, Cl: clearance total, Vd_{área}: volume de distribuição calculado pela ASC, VC: volume de distribuição central, Foral: biodisponibilidade. V.O: via oral; n.a: não aplicável. Fonte: do autor.

APÊNCIDE C - Resultados individuais do grupo III (administração oral de 50 mg de EFV-HDL)

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 7		
Dose (µg/Kg)	15772,87	17985,61	16051,36	18382,35	20593,08	18221,57		
Peso (kg)	3,17	2,78	3,115	2,72	2,428	2,744		
Parâmetros	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 7	Média	Desvio Padrão
K_{el} (min⁻¹)	0,0042	0,0015	0,0019	0,0026	0,001	0,0079	0,003183333	0,002564
T_{1/2} (min)	165	462	364,7368	266,5385	693	87,72152	339,8328038	218,9844
ASC_{0-T} (ug/mL.min)	300,356	131,3858	605,4363	424,9991	213,3836	334,6515	335,0353795	166,5444
ASC_{0-INF} (ug/mL.min)	307,8247	144,1461	650,2972	469,9864	341,2217	363,8161	379,5486945	169,5635
R áreas	0,975737	0,911476	0,931015	0,904279	0,625352	0,919837	0,877949464	0,126298
Cl (mL/min/Kg)	22,54551	54,90034	10,86057	17,20951	26,55445	22,03721	25,68459851	15,29086
Vd (mL/Kg)	5367,978	36600,22	5716,091	6619,042	26554,45	2789,52	13941,21835	14082,98
F	0,394865	0,162156	0,819701	0,517297	0,335252	0,403972	0,438873744	0,219838
ASMC_{0-t} (ug/mL.min)	110693,6	90514,81	702418,3	324839,5	101595,8	116125,8	241031,3092	242729,7
ASMC_{0-inf} (ug/mL.min)	120538	121990,3	855228,6	406924,1	367499	137316,4	334916,0485	285416,5
MTT (min)	391,58	846,2963	1315,135	865,8209	1077,009	377,4334	812,2125118	372,3033
K_a (min⁻¹)	0,0101	0,0026	0,0251	0,0028	0,0097	0,0084	0,009783333	0,00821
T_{1/2} absorção (min)	68,61386	266,5385	27,60956	247,5	71,4433	82,5	127,3675306	102,3178
MAT (min)	99,0099	384,6154	39,84064	357,1429	103,0928	119,0476	183,7915305	147,6447
T_{máx} (min)	360	360	240	720	240	360	411,4285714	181,4229
C_{máx} (ug/ml)	0,749901	0,253131	0,611444	0,76608	0,465879	1,540269	0,837316631	0,490431
MRT (min)	292,5701	461,6809	1275,294	508,6781	973,9166	258,3858	628,4209813	407,3512
T_{lag} (min)	0,574724	4,256888	0,831237	2,650592	2,199777	0,63305	1,857711456	1,462957
Vc (mL/kg)	2431,666	26829,46	6947,556	1573,877	43066,02	328,167	13529,45659	17509,94

Legenda de parâmetros: kel: constante de eliminação, t_{1/2}: meia-vida de eliminação, ka: constante de absorção, t_{1/2} a: meia-vida de absorção, T_{lag}: tempo para o início da absorção, MRT: tempo de residência médio, MAT: tempo de absorção médio, MTT: tempo de trânsito médio, T_{máx}: tempo de ocorrência de C_{máx}, C_{máx}: concentração plasmática máxima, Cl: clearance total, Vd_{área}: volume de distribuição calculado pela ASC, VC: volume de distribuição central, Foral: biodisponibilidade. V.O: via oral; n.a: não aplicável. Fonte: do autor.

APÊNCIDE D - Resultados individuais do grupo IV (administração oral de 50 mg de EFV-IFA+TNF/3TC)

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Média	
Dose (µg/kg)	17985,61	16655,56	15078,41	15862,94	13157,89	18089,73	16425,76	16179,41	
Peso (kg)	2,78	3,002	3,316	3,152	3,8	2,764	3,044	3,122571	
Parâmetros	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Média	Desvio Padrão
K_{el} (min⁻¹)	0,002	0,0014	0,0024	0,0019	0,0013	0,003	0,0013	0,0019	0,000638
T_{1/2} (min)	346,5	495	288,75	364,7368	533,0769	231	533,0769	398,8772	122,1191
ASC_{0-T} (ug/mL.min)	365,5054	1109,35	545,8275	581,619	843,2295	537,5425	692,2656	667,9056	243,924
ASC_{0-INF} (ug/mL.min)	425,5022	1463,597	567,4494	637,2822	929,2962	557,1585	907,9295	784,0307	352,7792
R áreas	0,858998	0,757961	0,961896	0,912655	0,907385	0,964793	0,762466	0,875165	0,086312
Cl (mL/min/Kg)	42,26914	11,37989	26,57225	24,89155	14,15493	32,46783	18,09144	24,261	10,82823
Vd (mL/Kg)	21134,57	8128,49	11071,77	13100,82	10888,41	10822,61	13916,5	12723,31	4145,981
MTT (min)	901,0369	1091,505	484,71	659,2938	946,3994	684,6989	1076,496	834,8772	229,8739
ASMC_{0-t} (ug/mL.min)	266999,4	834373,7	234903,7	310704,7	658360,2	346700,1	500931,7	450424,8	224936,9
ASMC_{0-inf} (ug/mL.min)	383393,2	1597523	275048,4	420156,2	879485,4	381485,8	977382,9	702067,8	478759,1
F_{oral}	0,478666	1,777942	0,761425	0,812837	1,428971	0,623164	1,118362	1,000195	0,467076
K_a (min⁻¹)	0,0028	0,0033	0,0123	0,0049	0,0026	0,0032	-	0,00485	0,003739
T_{1/2} absorção (min)	247,5	210	56,34146	141,4286	266,5385	216,5625	-	189,7285	78,09392
MAT (min)	357,1429	303,0303	81,30081	204,0816	384,6154	312,5	-	273,7785	112,6896
T_{máx} (min)	600	720	240	240	360	600	480	462,8571	188,831
C_{máx} (ug/mL)	0,620447	1,313627	1,113695	1,113474	0,857096	0,773134	0,891359	0,95469	0,237188
MRT (min)	543,894	788,4747	403,4092	455,2122	561,5158	372,1989	-	520,7841	151,0003
T_{lag} (min)	2,836334	1,151742	2,542984	3,315723	3,529821	2,275368	2,295193	2,563881	0,78767
Vc (mL/kg)	8805,885	4648,229	9201,966	10353,22	8768,416	3394,974	10060,92	7890,517	2733,326

Legenda de parâmetros: kel: constante de eliminação, t_{1/2}: meia-vida de eliminação, ka: constante de absorção, t_{1/2} a: meia-vida de absorção, T_{lag}: tempo para o início da absorção, MRT: tempo de residência médio, MAT: tempo de absorção médio, MTT: tempo de trânsito médio, T_{máx}: tempo de ocorrência de C_{máx}, C_{máx}: concentração plasmática máxima, Cl: clearance total, Vd_{área}: volume de distribuição calculado pela ASC, VC: volume de distribuição central, F_{oral}: biodisponibilidade. V.O: via oral; n.a: não aplicável. Fonte: do autor.

APÊNCIDE E - Resultados individuais do grupo V (administração oral de 50 mg de EFV-HDL+TNF/3TC)

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Média	
Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	14285,71	13248,54	13766,52	17507	16733,6	16181,23	13248,54	14995,87901	
Peso (kg)	3,5	3,774	3,632	2,856	2,988	3,09	3,774	3,373428571	
Parâmetros	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6	Animal 7	Média	Desvio Padrão
K_{el} (min^{-1})	0,0024	0,0015	0,0014	0,005	0,0028	0,0022	0,0041	0,002771429	0,001335
$T_{1/2}$ (min)	288,75	462	495	138,6	247,5	315	169,0244	302,26777	135,7359
ASC_{0-T} ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{min}$)	175,9309	125,0324	811,173	585,3583	339,0743	1326,194	119,5366	497,4714439	447,7608
ASC_{0-INF} ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{min}$)	175,9309	146,4651	954,3814	590,0805	383,7378	1335,799	120,2975	529,5274934	464,5308
R áreas	1	0,853667	0,849946	0,991997	0,88361	0,99281	0,993675	0,937957859	0,071516
Cl ($\text{mL}/\text{min}/\text{Kg}$)	56,8405	63,31872	10,09718	20,76819	30,52481	8,479463	77,09204	38,16012777	27,46772
Vd (mL/Kg)	23683,54	42212,48	7212,274	4153,637	10901,72	3854,301	18802,94	15831,55516	13813,4
MTT (min)	475,491	953,1829	1221,143	959,0067	677,8429	1303,794	677,3086	895,3955433	303,1768
$ASMC_{0-t}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{min}$)	83653,57	94456,56	805369,1	564946,8	195926,2	1709579	81292,95	505032,0758	600827,2
$ASMC_{0-inf}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{min}$)	83653,57	139608	1165436	565891,2	260113,9	1741607	81478,53	576826,8742	643344,2
F	0,24917	0,223677	1,402663	0,681954	0,463982	1,670264	0,183715	0,696489274	0,603845
K_a (min^{-1})	0,007	0,0034	0,0016	0,0051	0,0039	0,0024	0,0047	0,004014286	0,001798
$T_{1/2}$ absorção (min)	99	203,8235	433,125	135,8824	177,6923	288,75	147,4468	212,2457141	114,5719
MAT (min)	142,8571	294,1176	625	196,0784	256,4103	416,6667	212,766	306,2708717	165,3274
$T_{m\acute{a}x}$ (min)	240	480	720	1080	480	1080	480	651,4285714	323,9047
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0,374989	0,217934	0,909314	0,880242	0,605468	0,900607	2,436328	0,903554479	0,72896
MRT (min)	332,6339	659,0653	596,1427	762,9283	421,4326	887,1273	464,5426	589,1246716	197,2237
T_{lag} (min)	1,531942	2,727278	0,324322	0,004331	0,364271	0,058715	0,430231	0,777298453	0,998497
Vc (mL/kg)	15368	95759,19	3125,651	53,07575	1207,938	665,1123	3991,902	17167,2667	35049,02

Legenda de parâmetros: k_{el} : constante de eliminação, $t_{1/2}$: meia-vida de eliminação, k_a : constante de absorção, $t_{1/2 a}$: meia-vida de absorção, T_{lag} : tempo para o início da absorção, MRT: tempo de residência médio, MAT: tempo de absorção médio, MTT: tempo de trânsito médio, $T_{m\acute{a}x}$: tempo de ocorrência de $C_{m\acute{a}x}$, $C_{m\acute{a}x}$: concentração plasmática máxima, Cl: clearance total, V_d área: volume de distribuição calculado pela ASC, VC: volume de distribuição central, Foral: biodisponibilidade. V.O: via oral; n.a: não aplicável. Fonte: do autor.

ANEXO A – Protocolo CEUA/FCF/CAR

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Farmacocinética do efavirenz administrado na forma de nanopartículas inorgânicas em coelhos", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 15/2016, sob a responsabilidade de Evelin dos Santos Martins 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	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Abril de 2018
Espécie/linhagem/raça	Coelho Neozelandês
Nº de animais	35
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