

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS – FARMANGUINHOS

Thalita Martins da Silva

**Desenvolvimento de método de dissolução em meio biorrelevante
para comprimidos de efavirenz e correlação *in vitro-in vivo***

Rio de Janeiro
2019

Thalita Martins da Silva

Desenvolvimento de método de dissolução em meio biorrelevante para comprimidos de efavirenz e correlação *in vitro-in vivo*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Helvécio V. A. Rocha

2ª Orientadora: Profª. Drª. Beatriz F. C. Patricio

Rio de Janeiro
2019

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

S586d Silva, Thalita Martins da

Desenvolvimento de método de dissolução em meio biorrelevante para comprimidos de efavirenz e correlação in vitro-in vivo. / Thalita Martins da Silva. – Rio de Janeiro, 2019.

xix, 124 f. ; 30 cm.

Orientadores: Helvécio Vinicius Antunes Rocha e Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2019.

Bibliografia: f. 105-120

1. Dissolução. 2. Meios Biorrelevantes. 3. Correlação in vitro-in vivo. 4. GastroPlus. 5. Efavirenz. I. Título.

CDD 615.1

Thalita Martins da Silva

Desenvolvimento de método de dissolução em meio biorrelevante para comprimidos de efavirenz e correlação *in vitro-in vivo*

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

Aprovada em 18 de novembro de 2019

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ (Orientador)



Prof.ª. Dr.ª. Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ (2ª orientadora)



Prof.ª. Dr.ª Livia Deris Prado
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ



Prof. Dr. Jorge Carlos Santos da Costa
Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde – FIOCRUZ



Prof. Dr. Luiz Cláudio Rodrigues Pereira da Silva
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Rio de Janeiro
2019

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria do Carmo.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria do Carmo, pelos conselhos, pelo afeto, apoio e suporte em cada uma das decisões que enfrentei.

Ao meu noivo, Fabricio, pelo carinho, incentivo, compreensão, paciência e por sempre acreditar em mim.

Aos meus orientadores Helvécio Rocha e Beatriz Patricio pelo exemplo profissional, pela amizade, pela dedicação ao meu trabalho e pela disponibilidade em ouvir minhas propostas e sanar minhas dúvidas. Obrigada por acreditarem na minha habilidade e capacidade em realizar este trabalho.

À Universidade Federal Fluminense e ao Laboratório Universitário Rodolpho Albino pelo incentivo à qualificação de seus servidores.

À banca examinadora que gentilmente aceitou o convite para participação e colaboração na defesa desta dissertação.

Ao Laboratório de Modelagem Molecular e QSAR da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em especial, ao Dr. Thiago Honório, pelo auxílio, atenção e colaboração neste trabalho.

Ao colega Marcelo Chaves pelos treinamentos, pelo auxílio na realização dos experimentos e pela atenção dedicada durante o desenvolvimento deste trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Micro e Nanotecnologia de Farmanguinhos, pelo excelente ambiente de trabalho, em especial aos amigos Michelle, Flávia, Alexandrino, Mariana, Marina e Gabriel. Obrigada pela torcida, pelos momentos de descontração, amizade, pelas ricas discussões e por todos os cafés às 15 h.

Aos queridos amigos Andressa, Luiz e Lívia pela empatia, amizade, conselhos e pelo excelente convívio durante esses dois anos de mestrado.

Aos demais colegas de turma, em especial aos amigos André, Jorge e Felipe, pela parceria nas disciplinas da pós-graduação e por tornarem a rotina mais leve.

Aos professores do Programa de Pós-graduação de Farmanguinhos pelas ricas discussões e contribuições profissionais.

*“Cada frase que profiro deve ser entendida
não como uma afirmação, mas como uma pergunta.”*

Neils Bohr

RESUMO

SILVA, Thalita Martins da. *Desenvolvimento de método de dissolução em meio biorrelevante para comprimidos de efavirenz e correlação in vitro-in vivo*. 2019. 124 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

O efavirenz (EFV), fármaco classe II do sistema de classificação biofarmacêutica, possui absorção oral limitada pela solubilidade e dissolução *in vivo*. Os ensaios de dissolução são a principal ferramenta de avaliação do comportamento do fármaco *in vivo*, principalmente para os fármacos pouco solúveis. Entretanto, faz-se necessário que esses sejam preditivos e discriminativos. A utilização de meios de dissolução biorrelevantes tem sido descrita como mais efetiva no desenvolvimento de ensaios correlacionáveis com o comportamento *in vivo*, quando comparados aos meios de dissolução compendiais. O desenvolvimento do EFV por Farmanguinhos só foi possível a partir da utilização de um ensaio de dissolução capaz de discriminar as formulações propostas, visto que os métodos compendiais não foram positivos nesse aspecto. O presente trabalho teve como proposta o desenvolvimento de um método de dissolução preditivo do desempenho *in vivo* do EFV pela utilização de meios de dissolução biorrelevantes, estabelecimento uma correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) utilizando o programa GastroPlus™. O estudo da solubilidade mostrou que os tensoativos presentes nos meios biorrelevantes são capazes de promover a solubilização micelar do EFV, levando a valores mais elevados quando comparados à solubilidade aquosa. Assim, a dissolução nos meios biorrelevantes apresentou maior quantidade dissolvida de fármaco nos meios que simulam o estado alimentado do intestino, devido à saturação atenuada do fármaco nesses meios e à sua liberação gradual. Uma correlação de nível A foi obtida para o meio de dissolução FeSSIF-V2 utilizando o modelo tricompartmental de Loo-Riegelman ($r^2 = 0,99$). A concentração plasmática simulada em FeSSIF-V2 indica que este pode ser considerado um meio de dissolução preditivo do comportamento *in vivo* do EFV. A simulação da biodisponibilidade gastrointestinal e a CIVIV obtida para comprimidos de liberação imediata indicam que o GastroPlus é uma valiosa ferramenta *in silico* para o desenvolvimento e aprimoramento de formulações com fármacos pouco solúveis.

Palavras-chave: dissolução; meios biorrelevantes; correlação *in vitro-in vivo*; GastroPlus™; efavirenz.

ABSTRACT

SILVA, Thalita Martins da. *Desenvolvimento de método de dissolução em meio biorrelevante para comprimidos de efavirenz e correlação in vitro-in vivo*. 2019. 124 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Efavirenz (EFV) is a BCS class II drug that has oral absorption limited by its low aqueous solubility and *in vivo* dissolution. Especially for brick dust drugs *in vitro* dissolution tests are the main tool for predicting *in vivo* drug behaviour. However, it is necessary to assure that the method applied is discriminative. In comparison to the use of compendial standard dissolution media the application of biorelevant ones has been described as more effective in present results that can be correlated to *in vivo* behaviour. Concerning this, one case was the development of EFV by Farmanguinhos, which were only possible because of the employment of a suitable dissolution method that could discriminate between the proposed formulations. The present work aims to develop a predicting *in vivo* EFV dissolution performance by applying a biorelevant dissolution media besides using GastroPlus™ software to analyse the data and then establish an *in vitro-in vivo* correlation (IVIVC). The solubility study showed that the surfactants present in biorelevant media promotes micellar solubilization of EFV leading to higher solubility values when compared to the aqueous solubility. Furthermore, the dissolution in the biorelevant media displayed higher levels of dissolved drug in the media that simulates gut fed state due to the attenuated saturation of the drug in these media and its gradual release. A level A IVIVC was established for FeSSIF-V2 dissolution media using the Loo-Riegelman tricompartmental model ($r^2 = 0.99$). The simulated plasma concentrations indicated that FeSSIF-V2 can be considered a predicted dissolution media of EFV *in vivo* behavior. The simulation of gastrointestinal bioavailability and IVIVC obtained from immediate-release tablet formulations suggests that GastroPlus™ is a valid *in silico* tool for development and improve formulations using brick dust drugs.

Key-words: dissolution; biorelevant dissolution media; *in vitro-in vivo* correlation; GastroPlus™; efavirenz.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Curva típica de concentração plasmática *versus* tempo obtida após a administração por via oral de uma única dose de fármaco. C_{max} – concentração plasmática máxima; T_{max} – tempo para alcançar a concentração plasmática máxima; ASC – área sob a curva.22
- Figura 2: Diferentes sondas utilizadas nos sistemas de quantificação por UV *in situ*. A: sonda de transmitância convencional; B: sonda de transmitância otimizada; C: sonda tipo J; D: sonda em arco.....38
- Figura 3: Perfil de concentração plasmática ($\ln C_p$) *versus* tempo ilustrando um fármaco com distribuição a partir de um modelo bicompartimental (esquerda) e tricompartmental (direita).....50
- Figura 4: Representação esquemática de uma distribuição tricompartmental. K_{el} : constante de eliminação do fármaco; CEH: circulação entero-hepática.51
- Figura 5: Modelo de trânsito e absorção compartimental avançado (TACA) utilizado no programa GastroPlus™.....55
- Figura 6: Fórmula estrutural da molécula de efavirenz.58
- Figura 7: Perfil de solubilidade do efavirenz nos meios de dissolução testados. Os dados são apresentados como média e desvio padrão de três replicatas independentes.....75
- Figura 8: Perfis de dissolução de comprimidos de efavirenz 600 mg nos diferentes meios de dissolução testados quantificados por sonda de UV *in situ*. Os dados são apresentados como média de três replicatas independentes. As áreas sombreadas correspondem ao desvio padrão.....80
- Figura 9: Meios de dissolução biorrelevantes antes e após ensaio com um comprimido de 600 mg de efavirenz, evidenciando grande quantidade de partículas suspensas ao final do ensaio. A: FaSSIF antes do início do ensaio; B: FaSSIF após 180 minutos de ensaio de dissolução; C: meios de dissolução biorrelevantes utilizados; D: meios de dissolução FeSSIF e FeSSIF-V2 após 180 minutos de dissolução.82
- Figura 10: Perfis de dissolução de comprimidos de efavirenz 600 mg nos diferentes meios de dissolução testados quantificados CLAE/UV. Os dados são apresentados como média de triplicatas independentes. As áreas sombreadas correspondem ao desvio padrão.....83
- Figura 11: Comparação dos perfis de dissolução de comprimidos de efavirenz obtidos pela quantificação por sonda de UV *in situ* e por CLAE/UV, de acordo com o

meio de dissolução testado. Os dados são apresentados como média de três replicatas independentes e seus respectivos desvios padrão.....87

Figura 12: Perfis de concentração plasmática *versus* tempo dos dados observados *in vivo* (jejum) (HONÓRIO *et al.*, 2013) e simulados (jejum e alimentado) utilizando parâmetros físico-químicos e fisiológicos como dados de entrada para o GastroPlus™.....91

Figura 13: Simulação da absorção do efavirenz ao longo dos compartimentos intestinais.95

Figura 14: Correlação *in vitro-in vivo* para a dissolução de comprimidos de efavirenz em diferentes meios de dissolução de acordo com modelo tricompartmental (Loo-Riegelman). A - FeSSIF; B - FeSSIF-V2; C - FaSSIF; D - FaSSIF-V2; E - LSS 0,5%.96

Figura 15: Correlação *in vitro-in vivo* obtida através da convolução dos dados do estudo de dissolução em concentração plasmática simulada, utilizando o modelo tricompartmental (Loo-Riegelman). A - LSS 0,5%; B - FeSSIF; C - FeSSIF-V2.....99

Figura 16: Curva de regressão linear para o EFV em CLAE/UV..... 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de pH médios em humanos saudáveis nos estados alimentado e jejum em diferentes localizações do trato gastrointestinal.	27
Tabela 2: Concentração dos componentes fisiológicos duodenais em indivíduos saudáveis em jejum e após alimentação.....	29
Tabela 3: Composição do meio de dissolução FaSSGF, utilizado para simular as condições físico-químicas do estômago em jejum.	42
Tabela 4: Composição dos meios de dissolução FaSSIF, FaSSIF-V2, FeSSIF e FeSSIF-V2, utilizados para simular as condições físico-químicas do intestino delgado em jejum.....	44
Tabela 5: Composição do fluido colônico simulado do estado alimentado e não-alimentado.....	45
Tabela 6: Parâmetros relacionados ao fármaco utilizados para a simulação da biodisponibilidade de comprimidos de efavirenz 600 mg utilizando GastroPlus™. .	72
Tabela 7: Solubilidade do efavirenz nos diferentes meios de dissolução testados. Os dados são apresentados como média e desvio padrão de três replicatas independentes.....	74
Tabela 8: Valores para condição <i>sink</i> da dissolução de comprimidos de efavirenz 600 mg nos meios de dissolução testados.....	77
Tabela 9: Ensaio de recuperação do efavirenz nos meios de dissolução testados para avaliação da integridade do fármaco.	78
Tabela 10: Dados do fator de semelhança (F2) comparando todos os meios de dissolução biorrelevantes testados a partir da quantificação com sonda UV <i>in situ</i>	81
Tabela 11: Resultado do teste ANOVA <i>post hoc</i> Tukey para a comparação dos perfis de dissolução utilizando sonda UV <i>in situ</i> como método de quantificação.....	82
Tabela 12: Dados do fator de semelhança (F2) comparando todos os meios de dissolução biorrelevantes testados a partir da quantificação com CLAE/UV.	84
Tabela 13: Resultado do teste <i>two-way</i> ANOVA <i>post hoc</i> Tukey para a comparação dos perfis de dissolução utilizando CLAE/UV como método de quantificação.....	85
Tabela 14: Eficiência de dissolução a partir da quantificação utilizando sonda de UV <i>in situ</i> e CLAE/UV. Os dados são apresentados como média e desvio padrão de três replicatas independentes. Os desvios são apresentados em até duas casas decimais.	86

Tabela 15: Resultado da comparação estatística por <i>two-way</i> ANOVA dos métodos de quantificação avaliados em relação ao meio de dissolução testado.	88
Tabela 16: Parâmetros farmacocinéticos experimentais e simulados com base nos estudos de bioequivalência dos comprimidos de efavirenz 600 mg (indivíduos em jejum).	90
Tabela 17: Parâmetros farmacocinéticos observados <i>in vivo</i> e simulados segundo o modelo de Loo-Riegelman, baseado no estudo da dissolução do efavirenz em diferentes meios de dissolução.	98
Tabela 18: Dados fisiológicos utilizados na predição <i>in silico</i> da biodisponibilidade do EFV.	121
Tabela 19: Dados da curva analítica para quantificação de EFV por CLAE/UV ...	122
Tabela 20: Resumo da avaliação estatística da curva analítica.	122
Tabela 21: Dados dos perfis de dissolução do efavirenz em meios biorrelevantes e LSS 0,5% obtido por quantificação por sonda de UV <i>in situ</i> . Os dados são apresentados como média de três replicatas independentes.	123
Tabela 22: Dados dos perfis de dissolução do efavirenz em meios biorrelevantes e LSS 0,5% obtido por quantificação em CLAE/UV. Os dados são apresentados como média de três replicatas independentes.	124

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação biofarmacêutica proposta por Amidon e colaboradores (1995).....	24
Quadro 2: Parâmetros operacionais para quantificação do EFV por CLAE/UV.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área sob a curva
BDDCS	<i>Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System</i> (Sistema de Classificação Biofarmacêutica e Diposição de Fármacos)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CIVIV	Correlação <i>in vitro-in vivo</i>
C_{max}	Concentração plasmática máxima
CV	Coefficiente de variação
DCS	<i>Developability Classification System</i> (Sistema de Classificação e Desenvolvimento Farmacêutico)
DP	Desvio padrão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EFV	Efavirenz
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
F2	Fator de semelhança
FaSSGF	<i>Fasted State Simulating Gastric Fluid</i> (Fluido Gástrico Simulado no Estado Não Alimentado)
FeSSGF	<i>Fed State Simulating Gastric Fluid</i> (Fluido Gástrico Simulado no Estado Alimentado)
FaSSIF	<i>Fasted State Simulating Intestinal Fluid</i> (Fluido Intestinal Simulado no Estado Não Alimentado)
FaSSIF-V2	<i>Fasted State Simulating Intestinal Fluid Version 2</i> (Fluido Intestinal Simulado no Estado Não Alimentado Versão 2)
FaSSCOF	<i>Fasted State Simulating Colonic Fluid</i> (Fluido Colônico Simulado no Estado Não Alimentado Versão 2)
FeSSCOF	<i>Fed State Simulating Colonic Fluid</i> (Fluido Colônico Simulado no Estado Não Alimentado Versão 2)

FB	Farmacopeia Brasileira
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FeSSCOF	<i>Fed State Simulating Colonic Fluid</i> (Fluido Colônico Simulado no Estado Alimentado)
FeSSIF	<i>Fed State Simulating Intestinal Fluid</i> (Fluido Intestinal Simulado no Estado Alimentado)
FeSSIF-V2	<i>Fed State Simulating Intestinal Fluid Version 2</i> (Fluido Intestinal Simulado no Estado Alimentado)
FGH	Fluido gastrointestinal humano
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IFA	Insumo farmacêutico ativo
LSS	Lauril sulfato de sódio
P_{app}	Coeficiente de permeabilidade aparente
pH	Potencial Hidrogeniônico
pK_a	Potencial de ionização
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RIVIV	Relação <i>in vitro-in vivo</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SCB	Sistema de classificação biofarmacêutica
TDM_{VITRO}	Tempo de dissolução média <i>in vitro</i>
TRM_{VIVO}	Tempo de residência média <i>in vivo</i>
T_{max}	Tempo máximo para atingir a concentração plasmática máxima
TGI	Trato gastrointestinal
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	BIODISPONIBILIDADE	22
2.2	SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA (SCB).....	23
2.3	FATORES QUE AFETAM A ABSORÇÃO DO FÁRMACO POR VIA ORAL.....	26
2.3.1	Parâmetros Fisiológicos	27
2.3.1.1	pH gastrointestinal	27
2.3.1.2	Permeabilidade.....	28
2.3.1.3	Composição dos fluidos gastrointestinais.....	28
2.3.2	Parâmetros físico-químicos	30
2.3.2.1	Solubilidade	30
2.3.2.2	pK _a dos fármacos.....	31
2.3.2.3	Tamanho de partícula.....	32
2.4	ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO.....	33
2.4.1	Aparatos de dissolução	35
2.5	MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE PERFIS DE DISSOLUÇÃO.....	36
2.5.1	Métodos de quantificação <i>in situ</i>	37
2.6	MEIOS DE DISSOLUÇÃO.....	39
2.6.1	Meios de dissolução biorrelevantes.....	41
2.6.2	Simulando o estômago humano	41
2.6.3	Simulando o intestino delgado humano.....	43
2.6.4	Simulando o intestino grosso humano.....	44
2.7	CORRELAÇÃO <i>IN VITRO-IN VIVO</i>	46
2.7.1	Níveis de correlação	46

2.7.2	Aspecto regulatório.....	48
2.7.3	Modelos Compartimentais de Distribuição dos Fármacos	49
2.7.4	Modelos matemáticos.....	51
2.7.5	Predição da biodisponibilidade <i>in silico</i>	54
2.7.5.1	GastroPlus™.....	54
2.8	EFAVIRENZ: SCB CLASSE II	57
3	JUSTIFICATIVA.....	60
4	OBJETIVOS.....	62
4.1	OBJETIVO GERAL.....	62
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
5	MATERIAL E MÉTODOS	63
5.1	MATERIAL.....	63
5.1.1	Equipamentos.....	63
5.1.2	Insumos	63
5.2	MÉTODOS.....	64
5.2.1	Preparo das soluções	64
5.2.2	Preparo dos meios de dissolução.....	65
5.2.3	Curva analítica.....	66
5.2.4	Determinação da solubilidade	67
5.2.5	Avaliação da integridade química em solução do fármaco	68
5.2.6	Determinação do perfil de dissolução.....	68
5.2.6.1	Escolha do método de quantificação	68
5.2.7	Comparação dos perfis de dissolução.....	69
5.3	CORRELAÇÃO <i>IN VITRO-IN VIVO</i>	70
5.3.1	Estudo de bioequivalência.....	70
5.3.2	Simulação do comportamento gastrointestinal utilizando GastroPlus™.....	71

5.3.3	Correlação <i>in vitro-in vivo</i>	72
5.3.4	Avaliação estatística	73
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
6.1	DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE.....	74
6.2	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE QUÍMICA EM SOLUÇÃO DO EFAVIRENZ.....	78
6.3	PERFIL DE DISSOLUÇÃO COM QUANTIFICAÇÃO UTILIZANDO SONDA UV....	79
6.4	PERFIL DE DISSOLUÇÃO COM QUANTIFICAÇÃO POR CLAE/UV.....	83
6.5	CORRELAÇÃO <i>IN VITRO-IN VIVO</i>	90
6.5.1	Simulação do comportamento gastrointestinal utilizando o GastroPlus™	90
6.5.2	Correlação <i>in vitro-in vivo</i>	95
7	CONCLUSÃO	102
8	PERSPECTIVAS	104
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
10	ANEXO I. DADOS FISIOLÓGICOS UTILIZADOS COMO ENTRADA PARA PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	121
11	ANEXO II. CURVA ANALÍTICA DE EFV EM ACETONITRILA/ÁGUA (1:1) E RELATÓRIO ESTATÍSTICO	122
12	ANEXO III. DADOS DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO	123

1 INTRODUÇÃO

Os ensaios de dissolução estão envolvidos nas principais etapas da cadeia de produção de um medicamento, dentre elas o desenvolvimento da formulação, do processo de produção e o controle de qualidade, além de servir como base para correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) e para bioensaios (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002). Para as formas farmacêuticas sólidas, de uso oral, que veiculam fármacos pouco solúveis em água, trata-se da principal ferramenta de avaliação do comportamento do fármaco *in vivo* (FOTAKI *et al.*, 2013).

Os testes de dissolução descritos pelos principais compêndios farmacêuticos muitas vezes não possuem capacidade de diferenciar formulações de um mesmo fármaco visto que suas características físico-químicas diferem das condições *in vivo* (KLEIN, 2010). Desta forma, diversos estudos (FOTAKI; VERTZONI, 2010; JANTRATID *et al.*, 2008; JANTRATID; DRESSMAN, 2009; VERTZONI *et al.*, 2005) vêm investindo seus esforços no desenvolvimento de meios de dissolução e de condições experimentais que se assemelhem às condições *in vivo*. Isso inclui a mimetização das condições do trato gastrointestinal (TGI) humano através de ajustes no pH, na osmolaridade e pela inclusão de sais biliares nas condições de jejum e alimentação.

O efavirenz (EFV) é um fármaco pouco solúvel em água, pertencente à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), pois possui baixa solubilidade em água e alta permeabilidade nas membranas do trato gastrointestinal (AMIDON *et al.*, 1995; YANG; GREY; DONEY, 2010). Para os fármacos desta classe, a biodisponibilidade é limitada pelos processos de dissolução e solubilidade nos fluidos gastrointestinais (GALIA *et al.*, 1998). Por isso, o estudo da dissolução *in vitro* destes fármacos deve ser realizado de forma a fornecer dados discriminativos do fenômeno *in vivo* (LEHTO *et al.*, 2011). Quando assim realizados os dados da dissolução podem ser utilizados para prever o comportamento do fármaco *in vivo* e, assim, estabelecer uma correlação (BOU-CHACRA *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de métodos de dissolução preditivos do comportamento *in vivo* afeta, entre outros processos, o desenvolvimento de medicamentos genéricos. A produção do efavirenz (EFV) genérico por Farmanguinhos enfrentou dificuldades no

seu desenvolvimento. Enquanto os ensaios *in vitro* mostravam que havia semelhança no processo de dissolução entre a formulação proposta e a formulação do medicamento de referência, os ensaios *in vivo* resultaram na negativa quanto à bioequivalência das formulações. Assim, tornou-se necessário buscar um método *in vitro* que se correlacionasse com o comportamento da formulação *in vivo* e que fosse capaz de evidenciar os problemas da formulação proposta. A partir de um método de dissolução mais discriminativo, foi possível evidenciar as diferenças entre a formulação proposta e o medicamento de referência e garantir a bioequivalência com posterior registro do produto (FOLHA DE SÃO PAULO, 2018).

Este trabalho busca estudar a dissolução dos comprimidos de efavirenz produzidos por Farmanguinhos em meios de dissolução biorrelevantes, de forma a fornecer dados mais confiáveis do comportamento do fármaco *in vivo*, visando estabelecer uma CIVIV. A avaliação da dissolução através de métodos mais discriminativos auxilia nas estratégias de formulação, reduz os custos do desenvolvimento do medicamento e fornece dados para eventuais etapas pós-registro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIODISPONIBILIDADE

A biodisponibilidade é definida como a medida da velocidade e da extensão com as quais um fármaco atinge a circulação sistêmica (TOZER & ROWLAND, 2009). As medidas de biodisponibilidade baseiam-se na determinação da concentração do fármaco no sangue, supondo uma relação direta entre a concentração do ativo no plasma e a concentração disponível para atingir o seu local de ação (BUXTON, 2010). De modo geral, essas medidas envolvem o pico de concentração plasmática (C_{max}), o tempo para alcançar tal concentração (T_{max}) e a área sob a curva (ASC) da concentração do fármaco no sangue em função do tempo, que corresponde a sua extensão sistêmica (Figura 1).

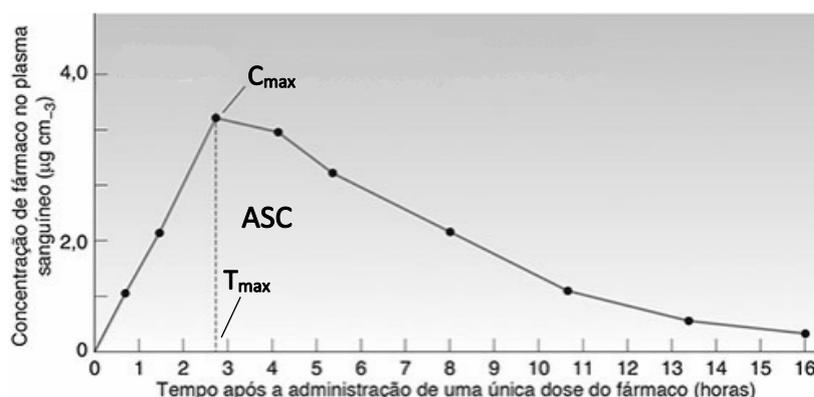


Figura 1: Curva típica de concentração plasmática *versus* tempo obtida após a administração por via oral de uma única dose de fármaco. C_{max} – concentração plasmática máxima; T_{max} – tempo para alcançar a concentração plasmática máxima; ASC – área sob a curva.

Fonte: adaptado de ASHFORD, 2016.

A legislação brasileira divide a biodisponibilidade em absoluta e relativa. A biodisponibilidade absoluta refere-se à quantificação da fração da dose que é absorvida após administração extravascular tendo como referência a administração do fármaco por via endovenosa. Na biodisponibilidade relativa, ou bioequivalência, ocorre a comparação dos parâmetros farmacocinéticos relacionados à biodisponibilidade de dois medicamentos quando um deles é tomado como referência (ANVISA, 2002). Os dados dos estudos de biodisponibilidade absoluta são utilizados, dentre outros, para identificar a farmacocinética de um medicamento aplicado por uma

via que não a endovenosa e otimizar um regime de dose terapêutica (ASHFORD, 2016 *apud* SKELLY, 1976). Para medicamentos sólidos administrados por via oral, a concentração de fármaco presente no sangue depende, inicialmente, da etapa biofarmacêutica, da dissolução do ativo, de sua permeação através das membranas biológicas celulares e do efeito de primeira passagem (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Os estudos de biodisponibilidade são úteis, ainda, na determinação da equivalência entre duas formulações. Medicamentos bioequivalentes apresentam, dentre outras características, a mesma forma farmacêutica e a mesma quantidade de princípio ativo. Ao serem administrados sob a mesma dose, nas mesmas condições experimentais, não apresentam diferenças estatísticas significativas em relação à biodisponibilidade (ANVISA, 2002).

Assim a absorção sistêmica dos fármacos pelo TGI pode ser estimada através da biodisponibilidade relativa, por meio de estudos farmacocinéticos. Estes estudos avaliam, em condições pré-estabelecidas, a concentração plasmática do fármaco em função do tempo. São realizados tanto para a aprovação de um medicamento novo quanto no registro de medicamentos genéricos e similares. Entretanto, tais estudos estão sujeitos a diversas variáveis populacionais, além de apresentarem alto custo para seus desenvolvedores (DEZANI *et al.*, 2013).

2.2 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA (SCB)

O SCB foi desenvolvido para correlacionar a dissolução de fármacos *in vitro* e sua biodisponibilidade *in vivo*, com base no reconhecimento de que a dissolução e a permeabilidade gastrointestinal são os parâmetros fundamentais que controlam a velocidade e a extensão da absorção do mesmo no organismo (AMIDON *et al.*, 1995, 2011; DEZANI, 2010; ROSENBERGER; BUTLER; DRESSMAN, 2018). Ou seja, a dissolução e a permeação têm impacto direto na biodisponibilidade. O objetivo deste sistema consiste em fornecer uma ferramenta regulatória para substituir determinados estudos de bioequivalência por ensaios de dissolução *in vitro*, o que reduz: a exposição de voluntários sadios, o tempo necessário para os processos de

desenvolvimento de fármacos e os seus custos (LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005). O Quadro 1 apresenta as classificações adotadas pelo sistema.

Quadro 1: Classificação biofarmacêutica proposta por Amidon e colaboradores (1995).

Classe	Solubilidade	Permeabilidade
I	Alta	Alta
II	Baixa	Alta
III	Alta	Baixa
IV	Baixa	Baixa

De acordo com Amidon e colaboradores (1995), na classe I considera-se que o fármaco é bem absorvido e que o fator limitante para a absorção é o esvaziamento gástrico. Neste caso, não se espera correlação com a velocidade de dissolução, visto que esta ocorre de forma muito rápida (AMIDON *et al.*, 2011; BONAMICI, 2009; DEZANI, 2010). Os fármacos desta classe são considerados candidatos à biosienção, ou seja, isenção e substituição dos estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência por ensaios *in vitro* (ANVISA, 2011).

Nos fármacos de classe II, como o efavirenz, a dissolução *in vivo* controla a absorção. A solubilidade no meio limita o fluxo de absorção e esta restrição se deve, tanto pela composição, quanto pelo volume do conteúdo no TGI, que impedem a completa dissolução do fármaco. Em alguns casos, os componentes presentes no TGI facilitam a dissolução, entretanto, a velocidade da dissolução é muito lenta para o local de absorção apropriado no intestino. Uma vez que o perfil fisiológico se modifica ao longo do intestino, o perfil de dissolução do fármaco também irá se modificar e, assim, determinar a concentração do fármaco ao longo do TGI. Consequentemente, a absorção ocorrerá em toda sua extensão, levando mais tempo, quando comparado com os fármacos da classe I (ASARE-ADDO; CONWAY, 2017).

Nos fármacos de classe III, como a cimetidina, a absorção é controlada pela capacidade do fármaco de permear as membranas fisiológicas. Nesses casos, o perfil de dissolução deve ser bem definido e, assim como para os fármacos da classe I, será aplicável, para formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata, a substituição dos ensaios de bioequivalência por ensaios *in vitro* (COOK; DAVIT; POLLI, 2010). Tanto a velocidade como a extensão da absorção podem ser altamente variáveis para essa classe de fármacos, mas se a dissolução for rápida, essas variações serão devido ao

trânsito intestinal, permeabilidade da membrana e conteúdo luminal, e não aos fatores relacionados à formulação (AMIDON *et al.*, 1995).

Os fármacos da classe IV, como a anfotericina B, apresentam problemas significativos na administração oral, uma vez que apresentam baixa solubilidade e permeabilidade no TGI, conforme indicado pelo Quadro 1 (AMIDON *et al.*, 1995; COOK; DAVIT; POLLI, 2010).

Desde sua criação, a aplicação do SCB caminhou para diferentes direções, desde a identificação da necessidade de alterações na formulação dos fármacos de classes II até as modificações químicas dos fármacos de classe III (BERGSTRÖM *et al.*, 2014). Resultou, ainda, no desenvolvimento do Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Disposição de Fármacos (BDDCS, do inglês *Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System*) (BENET *et al.*, 2008) e no Sistema de Classificação e Desenvolvimento Farmacêutico (DCS, do inglês *Developability Classification System*) (ROSENBERGER; BUTLER; DRESSMAN, 2018).

O SCB e o BDDCS são baseados nas mesmas definições de solubilidade, porém o segundo utiliza os dados de metabolismo ao invés de permeabilidade em sua classificação. A proposta do BDDCS diz que quando o metabolismo do fármaco é a sua principal via de eliminação, este pode ser considerado altamente permeável. Ao contrário, quando a eliminação do fármaco se dá através de excreção biliar ou eliminação renal de forma inalterada, o fármaco é classificado como pouco permeável (BENET *et al.*, 2008). Este sistema foi proposto para identificar padrões de disposição e de interações medicamentosas do fármaco, principalmente no intestino e no fígado (BROCCATELLI *et al.*, 2012). Enquanto isso, o SCB e o DCS têm a mesma definição de permeabilidade, mas o DCS é baseado em volumes maiores para a definição da solubilidade. Os volumes propostos no DCS são de 500 mL ao invés dos 250 mL utilizados na definição do SCB, refletindo melhor os volumes presentes no intestino delgado e compensando a redução da concentração do fármaco no intestino durante a dissolução, devido à absorção, e avaliação da solubilidade. O DCS é fundamental para sinalizar se os compostos da classe II da SCB são limitados pela velocidade de dissolução ou pela solubilidade, fatores importantes para a formulação (BERGSTRÖM *et al.*, 2014).

A RDC n. 37 de 3 de agosto de 2011 dispõe sobre o “Guia para Isenção e Substituição de Estudos de Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência” e elenca os fármacos indicados à bioisenção, de acordo com o SCB, de forma não limitada. Os fármacos listados incluem, entre outros, ácido acetilsalicílico, paracetamol, isoniazida e metronidazol. A lista apresenta fármacos com “alta permeabilidade intestinal, ampla faixa terapêutica e ausência de evidências documentadas de não bioequivalência ou problemas de biodisponibilidade associados à formulação” (ANVISA, 2011). A resolução se aplica a medicamentos novos, genéricos e similares e os estudos de bioequivalência podem ser dispensados em razão da forma farmacêutica ou com base no SCB. Neste último, o pleito pode ser realizado para medicamentos de administração oral, de liberação imediata, “formulados com excipientes que não apresentem impacto sobre a biodisponibilidade e que apresentem rápida dissolução *in vitro*” (ANVISA, 2011). A alta solubilidade deve ser comprovada conforme as recomendações do guia e deve ser avaliada a equivalência farmacêutica entre o medicamento genérico e o de referência, se aplicável, além das demais condições experimentais exigidas para a comprovação da rápida dissolução do fármaco (ANVISA, 2011).

O estudo realizado por Shohin e colaboradores (2013) avaliou a bioisenção de comprimidos de liberação imediata de piroxicam, um fármaco classe II. Os autores concluíram que a extensão da absorção do fármaco não depende das condições de fabricação ou dos excipientes, logo, os riscos de não bioequivalência em termos de ASC é baixo. Tendo em vista a posologia do medicamento, as variações observadas em C_{max} não são significativas, sendo viável, portanto, a bioisenção do medicamento.

2.3 FATORES QUE AFETAM A ABSORÇÃO DO FÁRMACO POR VIA ORAL

A tecnologia de produção e o controle de qualidade são fundamentais no desenvolvimento farmacotécnico de um novo medicamento. A qualidade no processo produtivo garante a eficácia terapêutica e a segurança. Entretanto, a eficácia clínica não é atribuída somente à sua atividade farmacológica intrínseca. Alguns fatores relacionados às propriedades físico-químicas do fármaco, bem como aos excipientes utilizados na formulação também são responsáveis por alterar o efeito do

medicamento, uma vez que alteram sua biodisponibilidade e outros parâmetros farmacocinéticos (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

A via oral de administração de medicamentos é considerada preferencial pela prática clínica em razão da maior adesão do paciente ao tratamento (BUXTON, 2010). Entretanto, ao atravessar o TGI o fármaco é exposto a condições adversas como variação do pH, metabolização enzimática, presença de alimentos, efeito de primeira passagem, entre outros. Essas intercorrências podem fazer com que os princípios ativos apresentem biodisponibilidade variada ou limitada após administração. Assim, a variabilidade na absorção oral depende de fatores gastrointestinais como a motilidade, o tempo de esvaziamento gástrico e a composição dos fluidos gastrointestinais humanos (FGH) (BUXTON, 2010). A seguir serão discutidos alguns parâmetros físico-químicos e fisiológicos citados e seu impacto na absorção e biodisponibilidade do princípio ativo.

2.3.1 Parâmetros Fisiológicos

2.3.1.1 pH gastrointestinal

O pH dos fluidos gastrointestinais sofre variação conforme sua localização no TGI. A Tabela 1 apresenta os valores de pH típicos dos fluidos do TGI em seu estado de jejum e alimentado.

Tabela 1: Valores de pH médios em humanos saudáveis nos estados alimentado e jejum em diferentes localizações do trato gastrointestinal.

Localização no TGI	pH sob alimentação	pH em jejum
Estômago	4,9	1,3
Duodeno	5,4	6,5
Jejuno	5,2 – 6,0	6,6
Íleo	7,5	7,4

Fonte: JAMBHEKAR; BREEN, 2013.

No caso de fármacos em que a solubilidade depende do pH, a variação do pH gástrico pode levar a precipitação ou supersaturação do fármaco (KOZIOLEK *et al.*, 2016). O estudo realizado por van den Abeele e colaboradores (2016) mostrou que após a administração oral de 240 mL de uma solução aquosa de diclofenaco de sódio,

ocorre a precipitação do fármaco no estômago. Tal fato deve-se ao pH gástrico ser menor que o pK_a do ácido livre. Todavia, o estudo concluiu que, neste caso, não houve prejuízo na absorção do fármaco tendo em vista sua redissolução quando o conteúdo gástrico é transferido ao intestino. O contrário ocorre com fármacos fracamente básicos, que podem precipitar na luz intestinal. Desse modo, os fármacos fracamente ácidos são mais facilmente solubilizados no pH intestinal (KOZIOLEK *et al.*, 2013, 2016).

2.3.1.2 Permeabilidade

A classificação da permeabilidade de um fármaco é relacionada diretamente com a quantidade de fármaco absorvida pelo TGI em humanos ou, de forma indireta, através das medidas de velocidade de transferência de massas pelas membranas intestinais. Os métodos utilizados, em sua maioria, incluem estudos em humanos, – biodisponibilidade absoluta, estudo do balanço de massas ou perfusão intestinal – estudo de perfusão intestinal em modelo animal, métodos *in vitro* utilizando seções de tecidos intestinais, ou ainda, culturas de monocamadas de células epiteliais intestinais (OLIVERIA; MANZO, 2009). Um fármaco é considerado altamente permeável quando a biodisponibilidade sistêmica ou a extensão de sua absorção é maior ou igual a 85% da dose administrada com base no balanço de massas ou em comparação com uma dose de referência intravenosa (ANVISA, 2011; CDER, 2017).

2.3.1.3 Composição dos fluidos gastrointestinais

A composição dos FGH tem impacto direto na dissolução e na permeação dos fármacos com solubilidade aquosa limitada. Entender a complexidade e a variabilidade da composição destes é fundamental para simulação adequada nos ensaios *in vitro* (AUGUSTIJNS *et al.*, 2014). Sabe-se que após a digestão enzimática de uma refeição, os produtos de degradação lipídica formam estruturas coloidais, influenciando a solubilidade e a permeabilidade dos componentes lipofílicos (CHRISTENSEN *et al.*, 2004).

Um estudo realizado por Riethorst e colaboradores (2016) caracterizou a composição dos fluidos duodenais, em função do tempo, de 20 voluntários saudáveis em jejum e após alimentação quanto ao pH e a concentração de sais biliares, fosfolípidios, colesterol e produtos de degradação lipídica. A Tabela 2 mostra os resultados apresentados pelo referido estudo. O trabalho comparou os dados encontrados em humanos com dados de outros trabalhos realizados em humanos e com fluidos simulados. Os autores, entretanto, afirmam que a composição média não se assemelha quantitativamente a nenhuma das amostras coletadas, evidenciando a alta variabilidade interindividual destes componentes.

Tabela 2: Concentração dos componentes fisiológicos duodenais em indivíduos saudáveis em jejum e após alimentação.

JEJUM					
Componente	Valor Médio	Valor Mínimo	Valor Máximo	Literatura	Fluidos Simulados
Sais biliares	4,61 mM	0,03 mM	36,18 mM	1,4 a 8,1 mM ^{a,b}	3 mM ^g
Fosfolípidios	0,95 mM	0,01 mM	6,33 mM	0,1 a 1,8 mM ^b	0,75 mM ^g e 0,2 mM ^h
Colesterol	0,07 mM	0,00 mM	0,48 mM	0,17 a 0,23 mM ^{c,d}	--
Ácidos graxos livres	0,53 mg/mL	0,00 mg/mL	3,86 mg/mL	0,4 a 0,6 mg/mL ^{e,f}	--
Monoacilglicerol	0,13 mg/mL	0,00 mg/mL	1,09 mg/mL	0,20 mg/mL ^f	--
ALIMENTADO					
Componente	Valor Médio	Valor Mínimo	Valor Máximo	Literatura	Fluidos Simulados
Sais biliares	4,61 mM	86,14 mM	0,74 mM	3,60 a 24,00 mM ^a	10,00 mM ^l e 15,00 mM ^m
Fosfolípidios	4,17 mM	0,16 mM	14,39 mM	1,20 a 6,00 mM ^a	3,75 mM ^l e 2,00 mM ^m
Colesterol	0,71 mM	0,00 mM	3,29 mM	0,90 mM ⁱ	0,45 mM ^{l,m}
Ácidos graxos livres	6,49 mg/mL	0,53 mg/mL	15,0 mg/mL	39,40 a 52,00 mM ^{i,j}	--
Monoacilglicerol	3,05mg/mL	0,00 mg/mL	11,36 mg/mL	--	--
Diacilglicerol	0,61 mg/mL	0,00 mg/mL	3,64 mg/mL	--	--
Triacilglicerol	0,81 mg/mL	0,00 mg/mL	6,76 mg/mL	--	--

a. BERGSTROM e cols. (2014); b. FUCHS e cols. (2014); c. HEIKKILA e cols. (2011); d. PSACHOULIAS e cols. (2011); e. ARMAND e cols. (1996); f. CLARYSSE e cols. (2009); g. Fluido intestinal simulado em jejum (FaSSIF); h. Fluido intestinal simulado em jejum, versão 2 (FaSSIF-V2); i. VERTZONI e cols. (2012); j. KALANTZI e cols. (2006); l. Fluido intestinal simulado alimentado (FeSSIF); m. Fluido intestinal simulado alimentado, versão 2 (FeSSIF-V2).

Fonte: adaptado de RIETHORST *et al.*, 2016.

A presença de surfactantes endógenos como os sais biliares e fosfolídeos auxiliam na solubilização dos compostos lipofílicos. Após a ingestão e digestão enzimática de uma refeição, há liberação de produtos de hidrólise lipídica como di- e monoacilgliceróis, além dos ácidos graxos livres, capazes de formar estruturas micelares impactando positivamente na solubilidade e permeabilidade desses fármacos (CHRISTENSEN *et al.*, 2004).

Dada a importância da composição dos FGH para a solubilização de compostos lipofílicos, a simulação adequada dos parâmetros fisiológicos deve levar em consideração a relevância de cada um dos componentes deste. Sua composição deve não só refletir as concentrações, mas as características físicas dos FGH como a tensão superficial, osmolaridade e força iônica. Assim, os tipos de fosfolípidos, ácidos graxos e sais biliares que devem ser utilizados para compor um meio de dissolução que pretende simular as condições *in vivo* devem ser cuidadosamente selecionados. Nos meios de dissolução biorrelevantes são comumente utilizados o taurocolato de sódio, e a lecitina, refletindo os sais biliares e os fosfolípidos, respectivamente (FUCHS; DRESSMAN, 2014).

2.3.2 Parâmetros físico-químicos

2.3.2.1 Solubilidade

A solubilidade é um parâmetro termodinâmico, definido em termos quantitativos como a concentração do soluto em uma solução saturada a uma dada temperatura (BRADY, RUSSEL & HOLUM, 2002). Esse parâmetro é dependente da natureza do solvente, do soluto, da temperatura e do pH (LAVRA; SANTANA; RÉ, 2017). A solubilidade de um fármaco depende de suas propriedades moleculares e de sua capacidade em formar interações com as moléculas do meio (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

A solubilidade e a biodisponibilidade estão intimamente relacionadas visto que a primeira é um fator determinante para a liberação do fármaco da formulação (PANCHAGNULA; THOMAS, 2000). De acordo com a RDC nº 31 de 11 de agosto de 2010:

é considerada altamente solúvel a substância ativa cuja quantidade correspondente a sua maior dose posológica disponível no mercado nacional é solúvel em 250 mL, ou menos, de meio aquoso em uma escala de pH de 1,2 – 6,8 em uma temperatura de 37 ± 1 °C (ANVISA, 2010).

O volume de 250 mL é derivado de protocolos típicos dos estudos de bioequivalência que orientam a administração de um medicamento a voluntários com 250 mL de água (CDER, 2017; EMA, 2007; ANVISA, 2011).

Os fármacos só são capazes de penetrar nas membranas da mucosa intestinal quando estão solubilizados. Quando a permeabilidade não limita a absorção, a entrada do fármaco na circulação sistêmica é determinada pela liberação do fármaco da sua forma farmacêutica. Assim, quando um fármaco é pouco solúvel nos FGH, a velocidade de dissolução é quem governa o processo de absorção (LAVRA; SANTANA; RÉ, 2017).

2.3.2.2 pK_a dos fármacos

Cerca de 95% dos fármacos são ácidos fracos ou bases fracas. Assim, o conhecimento do pH do meio e do pK_a da molécula é fundamental na etapa de desenvolvimento de formulações, pois são propriedades que afetam diretamente tanto a solubilidade quanto a dissolução e, conseqüentemente, a biodisponibilidade (BONAMICI, 2009).

O grau de ionização de um fármaco em um fluido gastrointestinal pode ser simplifiadamente descrito pela equação de Henderson-Hasselbach (Equação 1) (SKOOG *et al.*, 2005). Ela evidencia o cálculo da extensão de ionização de um fármaco fracamente ácido, com um único grupo ionizável.

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad \text{Equação 1}$$

Assim, um fármaco fracamente ácido com pK_a 3,0 estará predominantemente não ionizado no fluido gástrico (pH 1,2) e quase totalmente ionizado no fluido intestinal (pH 6,8). O contrário ocorre para um fármaco fracamente básico (pK_a 5,0) (ASHFORD, 2016).

A hipótese de partição por pH para a absorção dos fármacos sugere que o epitélio gastrointestinal age como uma barreira lipídica aos fármacos que são absorvidos por difusão passiva. Assim, os fármacos mais lipossolúveis atravessarão mais facilmente as membranas celulares. Portanto, a absorção de um eletrólito fraco será determinada principalmente pela extensão na qual o fármaco existe na sua forma não-ionizada no local de absorção (ASHFORD, 2016b *apud* OVERTON *et al.*, 1899).

A partir desta analogia, fármacos fracamente ácidos seriam melhor absorvidos no estômago enquanto fármacos fracamente básicos, no intestino. Na prática, sabe-se que muito pouco do fármaco é absorvido no estômago, tendo em vista a maior superfície de contato e tempo de estada deste no intestino (ASHFORD, 2016b).

2.3.2.3 Tamanho de partícula

As propriedades micrométricas dos sólidos como a área superficial e o tamanho de partícula têm impacto direto na biodisponibilidade e processabilidade das formas farmacêuticas sólidas. A velocidade com a qual um sólido se dissolve é diretamente proporcional à sua área superficial exposta. Assim, a redução do tamanho de partícula é um dos métodos de aumento da velocidade de dissolução e da biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis (HE, 2009).

Costa e colaboradores (2013) desenvolveram e caracterizaram sistemas micronizados e co-processados contendo EFV e lauril sulfato de sódio (LSS) ou polivinilpirrolidona como carreadores para melhora do processo de dissolução. O estudo mostrou que houve aumento da velocidade de dissolução do insumo farmacêutico ativo (IFA) em todas as amostras testadas quando comparadas ao fármaco não processado. A amostra contendo LSS mostrou ser um melhor carreador no processo de micronização.

Entretanto, nem sempre a redução do tamanho de partícula resulta no aumento da velocidade de absorção. Os fármacos de classe I, por exemplo, apresentam níveis de concentração plasmática que independem do tamanho de partícula. Neste caso, a solubilidade não é um fator limitante da absorção (BONAMICI, 2009).

2.4 ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO

Os ensaios de dissolução são de grande relevância no âmbito das ciências farmacêuticas, possuindo aplicação tanto na rotina do controle de qualidade de medicamentos quanto na pesquisa e desenvolvimento de formas farmacêuticas. No âmbito regulatório, os estudos de perfil de dissolução são essenciais para a avaliação da equivalência farmacêutica, além de colaborarem para o estabelecimento de correlações *in vitro-in vivo* (ANVISA, 2010).

Diferente do método empregado no controle de qualidade, durante o desenvolvimento é estudado o perfil de dissolução de uma forma farmacêutica. Este consiste em um ensaio analítico *in vitro* com coletas em múltiplos tempos para a avaliação da dissolução de um determinado fármaco que pode ser comparada ao desempenho de outras formulações (ANVISA, 2010a). Os dados obtidos do perfil de dissolução permitem a construção de uma curva de porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo. A legislação brasileira utiliza o método Modelo Independente Simples para avaliar a semelhança entre perfis de dissolução de formulações diferentes (ANVISA, 2010).

Noyes e Whitney (1897) descreveram, com base na segunda lei de difusão de Fick, que a velocidade de dissolução é proporcional à diferença de concentração em um determinado tempo e à solubilidade máxima no meio de dissolução em análise, como descrito pela Equação 2:

$$\frac{dC}{dt} = K (C_s - C_t) \quad \text{Equação 2}$$

Onde,

dC/dt = gradiente de dissolução do fármaco em função do tempo (velocidade de dissolução).

K = constante de dissolução.

C_s = concentração de saturação do fármaco na solução (solubilidade máxima).

C_t = concentração do fármaco em solução no tempo t .

O princípio básico da dissolução consiste no fato de que, na forma farmacêutica, moléculas vizinhas estão associadas por meio de interações

moleculares umas com as outras e para que a dissolução ocorra é preciso que essas interações sejam rompidas e que novas sejam formadas entre as moléculas do fármaco e o meio de dissolução (WANG & FLANAGAN, 2009). Inicialmente, o fenômeno da dissolução foi descrito pela formação de uma camada de difusão ao redor de uma partícula sólida em contato com o meio, pelo qual as moléculas do fármaco difundem-se e são dissolvidas (AULTON, 2016 *apud* NOYES & WITHNEY, 1897). Neste último, ocorre o transporte de massa da molécula solvatada na interface sólido-líquido para o volume total do líquido que, geralmente, ocorre de forma mais lenta (AULTON, 2016; WANG; FLANAGAN, 2009). Este modelo de difusão em camadas leva a formação de uma camada de solvatação.

A equação de Noyes e Whitney foi modificada por Nernst e Brunner considerando o coeficiente de difusão (D), a área superficial (S), a espessura da camada de difusão (h) e o volume do meio de dissolução (V), principais parâmetros que influenciam no ensaio, como pode ser observado na Equação 3 (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002 *apud* NERNST, BRUNNER, 1904).

$$\frac{dC}{dt} = K \times \frac{D \times S}{V \times h} \times (C_s - C_t) \quad \text{Equação 3}$$

Para fármacos altamente permeáveis, a taxa de dissolução por unidade de superfície é próxima da taxa de dissolução inicial. Portanto, pode-se estabelecer a condição *sink*, onde tem-se menos de 10% da concentração de saturação do fármaco no meio de dissolução. Para fármacos menos permeáveis a taxa de dissolução por unidade de superfície diminui com o tempo, devido ao aumento gradual da concentração do fármaco no TGI (DRESSMAN *et al.*, 1998). A condição *sink* ocorre no organismo para os fármacos da classe I e alguns da classe II porque, neste caso, o fármaco é absorvido pelas membranas celulares a partir da sua solubilização nos fluidos gastrointestinais em uma velocidade mais rápida do que se dissolve nestes fluidos, a partir da forma farmacêutica sólida (AULTON, 2016).

Tendo em vista tal comportamento é importante conhecer a solubilidade do fármaco em diferentes condições de pH, a 37 °C, antes de desenvolver um método de dissolução. De acordo com a farmacopeia americana USP (do inglês, *United States*

Pharmacopeia) a condição *sink* é alcançada quando o meio de dissolução selecionado é capaz de solubilizar até três vezes a dose do fármaco de interesse (USP, 2016; LONG; CHEN, 2009).

O estudo realizado por Gu e colaboradores (2004) buscou demonstrar a importância do volume do meio de dissolução na predição da biodisponibilidade das formulações. O estudo utilizou volumes de meio de dissolução reduzidos onde as quantidades de fármaco dissolvido correlacionaram-se com a biodisponibilidade *in vivo* para o fármaco testado. Entretanto, o fármaco estudado necessitava da conversão em sua base livre, processo mediado pela dissolução. Ao utilizar uma grande quantidade de meio de dissolução, para respeitar a condição *sink*, não houve conversão do sal em sua base livre devido à rápida difusão do soluto. Dessa forma, como o volume de fluido gástrico em jejum também é reduzido, o ensaio em volumes reduzidos foi capaz de prever o perfil de dissolução do fármaco *in vivo* de forma mais adequada.

Além dos fatores relacionados ao fármaco, à forma farmacêutica e às condições fisiológicas, a velocidade de dissolução também sofre influência dos fatores hidrodinâmicos como o aparato utilizado, a velocidade de rotação, o meio de dissolução, temperatura, viscosidade, pH, força iônica, osmolaridade e presença de surfactantes (PINTO; CABRAL; DE SOUSA, 2014). E ainda os relacionados a quantificação como os sistemas de filtração, a automação, a influência dos gases no meio, dentre outros (MARCOLONGO, 2003; GAO *et al.*, 2006).

2.4.1 Aparatos de dissolução

A Farmacopeia Brasileira (FB, 2019) descreve três aparatos de dissolução. O aparato 1 utiliza cestas onde a forma farmacêutica deve ser posicionada dentro da cesta seca antes do início do teste. Já o aparato 2 utiliza pás na extremidade da haste, capazes de girar sem desvio de seu eixo. Neste, é importante que as amostras não flutuem durante o ensaio e pode-se recorrer a dispositivos que evitem isso (chamados afundadores ou “*sinkers*”) desde que eles não diminuam o contato da forma farmacêutica com o meio de dissolução ou deformem-na. Além destes, há ainda o aparato 3, cilindros recíprocos, descrito pela FB. A USP descreve, o aparato 4,

conhecido como método de células de fluxo (USP, 2016). A escolha do aparato deve dar-se de modo que o método de dissolução apresente melhor poder discriminativo e se adeque a forma farmacêutica avaliada mediante modificações na sua formulação.

Os parâmetros utilizados para o perfil de dissolução variam de acordo com o ensaio de dissolução descrito na monografia do fármaco. No caso de não haver método de dissolução compendial, um novo método pode ser desenvolvido segundo o Guia n. 14 de 08 de fevereiro de 2018 e devidamente validado segundo a RDC n. 166 de 24 de julho de 2017 (ANVISA, 2017; 2018).

2.5 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE PERFIS DE DISSOLUÇÃO

Como apontado anteriormente, o estudo da dissolução é uma ferramenta crítica para o desenvolvimento e seleção de formulações, bem como para estudos de bioequivalência. Tradicionalmente, a avaliação do perfil de dissolução é realizada através da coleta de alíquotas, processamento de amostras e quantificação por métodos clássicos como a espectrometria em UV ou a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV (CLAE/UV) permitindo a avaliação da dissolução e comparação do desempenho de formulações (ANVISA, 2010a). Um perfil de dissolução completo, com resolução temporal adequada e número de coletas representativo é útil além das fronteiras do controle de qualidade pois contém informações fundamentais para o entendimento das etapas limitantes da dissolução de um fármaco (LU *et al.*, 2003).

Entretanto, a coleta de alíquotas durante o ensaio e o processamento das amostras pode consumir tempo e promover variabilidade dos resultados, dificultando a identificação dos efeitos das modificações na formulação (LIU *et al.*, 2011). Tais variações podem envolver o analista, os aparatos de filtração da amostra ou os intervalos de alíquotagem, por exemplo. Os ensaios utilizando a quantificação do analito *in situ* exigem menor intensidade de trabalho, além de reduzir o tempo de resposta dos dados, com intervalos de tempo menores, refletindo o comportamento da formulação de forma mais precisa (GRAY, 2003). Trata-se da utilização de sondas dentro das cubas de dissolução, que permitem a quantificação do analito em tempo real.

2.5.1 Métodos de quantificação *in situ*

Os métodos de quantificação da dissolução *in situ* vêm sendo desenvolvidos há cerca de 30 anos (JOSEFSON *et al.*, 1988). Os sistemas de UV *in situ* compartilham a maioria dos elementos dos espectrofotômetros tradicionais. Entretanto, ao invés de utilizar uma cubeta para o armazenamento de amostras são utilizadas fibras óticas que transmitem a luz UV da fonte até a amostra e da amostra até o detector e o caminho ótico é definido pelas sondas *in situ*. Os sistemas propostos variam, em maioria, de acordo com o desenho da sonda e o tipo de detector utilizado (LU *et al.*, 2003).

Os sistemas são capazes de medir todas as cubas ao mesmo tempo. O mais simples deles, utiliza um detector baseado em matriz de diodos (DAD, do inglês *diode-array detector*) *multiplex*, onde a sonda é alternada sequencialmente entre as cubas. Neste caso a dissolução não é medida simultaneamente de forma real, sendo necessário validar a reprodutibilidade do sistema. Uma alternativa é utilizar um detector em cada uma das cubas, o que permite a medida simultânea, mas necessita de validação e correlação entre eles, porque seria o mesmo que utilizar diferentes espectrofotômetros. Para medidas simultâneas em todas as cubas do dissolutor utilizando apenas um detector, alguns sistemas adotam os dispositivos de carga acoplada (CCD, do inglês, *charge coupled device*). Neste, o espectro de cada uma das sondas é criado em uma parte separada do detector (NIR & LU, 2018).

Em relação às sondas utilizadas na quantificação, a principal preocupação é o comprometimento da hidrodinâmica do processo de dissolução (NIR & LU, 2018; LU *et al.*, 2003). A Figura 2 apresenta os tipos utilizados. Nestes é importante levar em consideração o aprisionamento de bolhas durante o ensaio, o comprometimento da hidrodinâmica do meio de dissolução e o caminho ótico disponível. As sondas em arco (Figura 2D) utilizam hastes curvas de entrada e saída, uma de frente para a outra, separadas por um espaço fixo, o caminho ótico. Quando comparada aos demais modelos essa é mais fina com um espaço horizontal com menor probabilidade de capturar bolhas ou partículas e é capaz de suportar comprimentos de caminho óticos de até 0,25 mm, permitindo a quantificação de soluções mais concentradas (NIR & LU, 2018).

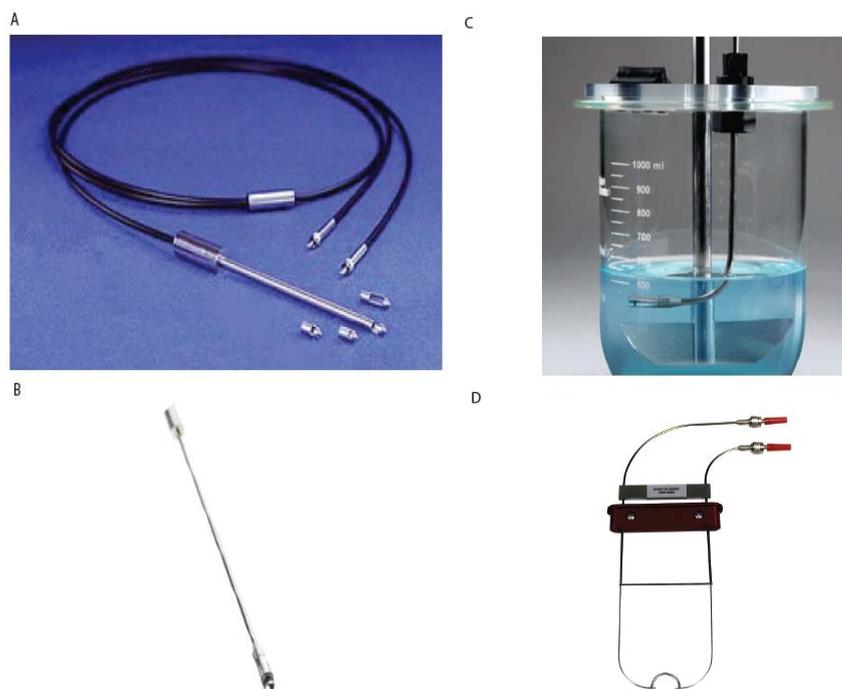


Figura 2: Diferentes sondas utilizadas nos sistemas de quantificação por UV *in situ*. A: sonda de transmitância convencional; B: sonda de transmitância otimizada; C: sonda tipo J; D: sonda em arco.
Adaptado de: NIR & LU, 2018.

A literatura apresenta avaliações técnicas sobre as vantagens e desvantagens dos instrumentos de fibra ótica para quantificação da dissolução (INMAN *et al.*, 2001), bem como fornece abordagens para a solução de problemas de interferência causados pelos excipientes durante os ensaios (LIU *et al.*, 2008). O método também pode ser aplicado no controle de qualidade (GRAY, 2003), na qual a USP identifica-o como um método de detecção alternativo para os ensaios de dissolução desde que forneça vantagens em termos de precisão, sensibilidade, seletividade ou automação e, possa ser validado (MIRZA *et al.*, 2009; USP, 2016).

A utilização das sondas de quantificação *in situ* também apresenta aplicação nos estudos de dissolução preditivos pois permite a caracterização do fármaco e fornece informações sobre os minutos iniciais do processo de dissolução, auxiliando no desenvolvimento de formulações. A aquisição de dados em intervalos de tempo

reduzidos e sem necessidade de tratamento de amostra é uma vantagem frente aos métodos de quantificação tradicionais (NIR & LU, 2018).

No que se refere ao desenvolvimento de formulações, o monitoramento *in situ* da dissolução facilita o entendimento das etapas limitantes na dissolução das formulações de liberação imediata, por exemplo. É útil, ainda, nos testes preditivos de dissolução, nos quais o elevado número de dados nos minutos iniciais do ensaio permite prever com precisão os resultados da dissolução de formulações de liberação prolongada, reduzindo a duração e o custo dos mesmos (LU *et al.*, 2003).

Da mesma forma, também há vantagens para a rotina do controle de qualidade, visto que a técnica produz perfis completos e resultados em tempo real permitindo usar as informações para investigação de testes fora de especificação. Outro benefício é a automação do processo, uma vez que a eliminação da amostragem remove os erros sistemáticos, como tempos de amostragem incorretos, posições, filtros e manuseio. Além disso, também evita problemas de transporte de amostra, contaminação cruzada de filtros e linhas associados à amostragem automática de líquidos e, ainda, elimina a necessidade de reposição de meio de dissolução. A análise *in situ* elimina a possibilidade de amostras parcialmente filtradas continuarem a se dissolver até que a medição real possa ser feita (NIR & LU, 2018).

Contudo, o principal desafio desta técnica consiste na capacidade de determinar o analito diretamente dentro da cuba de dissolução onde outros componentes podem interferir na quantificação, seja absorvendo ou dispersando a luz. Para isso, os sistemas utilizam “filtros matemáticos” que são capazes de remover a contribuição de componentes diferentes do fármaco, e, alguns casos, estes podem não ser suficientes (NIR & LU, 2018).

2.6 MEIOS DE DISSOLUÇÃO

A seleção de um meio de dissolução deve, primeiramente, levar em consideração o percurso da forma farmacêutica oral *in vivo* através do TGI. Isso envolve modificações de pH de, aproximadamente, 1,6 no estômago até 7,4 no cólon. É importante considerar, ainda, o tempo de permanência do fármaco em cada

condição bem como as demais propriedades físico-químicas que envolvem a fisiologia da digestão como a capacidade tamponante dos fluidos digestivos e sua osmolaridade (LONG; CHEN, 2009).

Para fármacos ionizáveis, a primeira alteração nos ensaios de dissolução para se obter condição *sink* é o ajuste do pH. Os meios de dissolução compendiais fazem uso de soluções ácidas, soluções tampão e ainda soluções contendo surfactantes visando produzir um ensaio capaz de simular o perfil de dissolução de uma forma farmacêutica *in vivo* (WANG; FLANAGAN, 2009).

Os meios que utilizam sistemas de tamponamento são indicados quando a dissolução do fármaco ou dos excipientes é sensível ao pH. Em meios não tamponados, a dissolução de moléculas ionizáveis pode criar uma alteração no pH próximo a superfície da forma farmacêutica ou ainda pode levar a uma modificação do pH ao longo do ensaio de dissolução. Essas alterações promovem variáveis não controladas durante o ensaio, dificultando a interpretação dos resultados (LONG; CHEN, 2009).

Para os fármacos pouco solúveis, as soluções tampão não são fisiologicamente relevantes e podem ser insuficientes para permitir o uso de um volume prático de meio para manter as condições *sink*. Assim, faz-se uso de surfactantes nos meios de dissolução, como o lauril sulfato de sódio, de modo a aumentar a velocidade de dissolução dos fármacos. Estudos realizados com diferentes tipos de surfactantes sintéticos, como lauril sulfato de sódio (LSS) e polissorbato 20 (Tween® 20), apresentaram aumento na solubilização de griseofulvina em comparação com sua solubilização na água (LÖBENBERG; AMIDON, 2000).

No TGI, os sais biliares e a lecitina são os surfactantes fisiologicamente presentes. Eles aumentam a molhabilidade e incrementam a solubilidade de diversas substâncias lipofílicas. As interações dos fluidos intestinais com os componentes lipídicos e alimentares promovem a formação de emulsões e contribuem para o aumento da solubilidade de compostos pouco solúveis, inclusive fármacos (LÖBENBERG; AMIDON, 2000). Neste contexto, o incremento da dissolução dos fármacos pela adição de surfactantes sintéticos aos meios de dissolução tem levado pesquisadores a desenvolver novos meios que mimetizem o ambiente *in vivo*, de

forma a auxiliar o estabelecimento de correlações entre esses dados. A CIVIV consiste no desenvolvimento de um modelo matemático que estabeleça uma correlação linear ou não entre uma propriedade *in vitro*, geralmente a fração dissolvida do fármaco, e a propriedade *in vivo*, geralmente a fração absorvida do fármaco. Os tipos de CIVIV estão descritos no item 2.7 deste texto.

2.6.1 Meios de dissolução biorrelevantes

Os meios biorrelevantes são aqueles que apresentam componentes similares aos presentes no TGI humano ou animal e têm por objetivo simular as condições fisiológicas em segmentos específicos. Nesses meios, o pH, a osmolaridade e a tensão superficial são adaptadas para reproduzir as condições fisiológicas (BOUCHACRA *et al.*, 2017).

Uma das primeiras tentativas de reproduzir *in vitro* as condições de dissolução dos fármacos no TGI foi apresentada por Macheras, Koupparis e Tsaprounis (1986) que avaliaram o perfil de dissolução dos fármacos nitrofurantoína, piroxicam, indometacina, prednisolona, diazepam, dicumarol e griseofulvina utilizando leite integral como meio de dissolução, na tentativa de mimetizar o estado alimentado do intestino delgado.

Além das composições simulando o trato gastro intestinal humano existem, ainda, composições que mimetizam o TGI de cães. Uma de suas utilidades é na avaliação de novos fármacos e de medicamentos veterinários (WALSH *et al.*, 2016).

2.6.2 Simulando o estômago humano

Os estudos de Dressman e colaboradores (1998) e Galia e colaboradores (1999) já haviam proposto a adição de surfactantes sintéticos como LSS e Triton-X 100® para reduzir a tensão superficial do meio para valores fisiológicos. No entanto, estes meios superestimavam a dissolução gástrica porque induziam efeitos de solubilização maiores do que os apresentados fisiologicamente (VERTZONI *et al.*, 2005). O fluido gástrico simulado em jejum (FaSSGF, do inglês *Fasted State Simulating Gastric Fluid*) foi proposto por Vertzoni e colaboradores (2005). A

composição do FaSSGF está descrita na Tabela 3. Neste, a tensão superficial é reduzida pela presença de concentrações fisiológicas de enzimas e surfactantes que mimetizam as condições gástricas, ao invés da simples adição de um surfactante sintético (JANTRATID *et al.*, 2008).

De modo a reproduzir o estado alimentado no estômago humano os meios de dissolução alternativos utilizam leite longa vida integral ou suplemento alimentar Ensure® Plus, proposto por Klein e colaboradores (2004). Esses apresentam as mesmas propriedades físico-químicas que a refeição padrão recomendada nos estudos de bioequivalência e biodisponibilidade pela *Food and Drug Administration* (FDA). O fluido gástrico simulado no estado alimentado (FeSSGF, do inglês *Fed State Simulating Gastric Fluid*) apresenta em sua composição gorduras, carboidratos, fibras e sais biliares, visando simular a refeição padrão rica em gordura utilizada nos estudos clínicos (BIORELEVANT, 2019).

Tabela 3: Composição do meio de dissolução FaSSGF, utilizado para simular as condições físico-químicas do estômago em jejum.

Composição do FaSSGF	
Taurocolato de sódio (μM)	80,0
Lecitina (μM)	20,0
Pepsina (mg/mL)	0,1
Cloreto de sódio (mM)	34,2
Ácido clorídrico q.s.	pH 1,6
pH	1,6
Osmolaridade ($\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$)	120,7
Tensão Superficial (mN/m)	42,6

Fonte: Adaptado de VERTZONI *et al.*, 2005.

Uma questão importante ao tentar simular o ambiente gástrico alimentado é que sua composição muda com o tempo à medida que a digestão ocorre e o esvaziamento do estômago acontece. Uma forma de modelar isso pode ser dada pela adição de uma solução ácida de pepsina ao leite (FOTAKI, 2005). Uma abordagem alternativa é retratar os períodos que correspondem a cada etapa após a ingestão de uma refeição, sendo eles, antes (75 minutos), durante (75 a 165 minutos) e depois (165 minutos), conforme descrito por Jantraid e colaboradores (2008). A composição dos meios de dissolução é calculada para refletir o pH, a capacidade tamponante e a

osmolaridade durante todo o processo. Admite-se que a composição do FeSSGF no estágio intermediário (durante) pode ser utilizado, em sua maioria, para prever o estado pós-prandial e, em conjunto com o FaSSGF, simular os efeitos da alimentação após a administração dos medicamentos (JANTRATID *et al.*, 2008).

2.6.3 Simulando o intestino delgado humano

A primeira geração dos meios biorrelevantes utilizados para simular os fluidos do intestino, FaSSIF (Fluido Intestinal Simulando o Jejum, do inglês, *Fasted State Simulating Intestinal Fluid*) e FeSSIF (Fluido Intestinal Simulando o Estado Alimentado, do inglês, *Fed State Simulating Intestinal Fluid*), foram publicados por Galia e colaboradores (1998). Avaliou-se a dissolução de danazol em diversos meios de dissolução, incluindo água, fluido gástrico simulado (USP), FaSSIF e FeSSIF. Os resultados mostraram que para este fármaco de classe II do SCB, a dissolução em água é insignificante, a dissolução em fluido gástrico simulado é detectável, mas não é completa e a dissolução em FeSSIF é mais rápida do que em FaSSIF. Assim, comparativamente, pelos testes *in vitro* sugere-se que a absorção do danazol seja três vezes maior quando administrada com alimentos, fato comparável com os resultados em humanos saudáveis (GALIA *et al.*, 1998).

Os estudos *in vivo* realizados por Porter e colaboradores (2007) serviram de base para elaboração de meios biorrelevantes mais representativos dos estados alimentados e jejum do intestino delgado. Para refletir tais condições, da mesma forma como foi realizado para o FaSSGF, cada uma das etapas do processo digestivo no intestino delgado reproduzida: antes, durante e depois. Os novos meios foram comparados com aspirados do TGI humano de modo a refletir suas propriedades físico-químicas e bioquímicas (JANTRATID; DRESSMAN, 2009).

A segunda geração desses meios ficou conhecida como Fluido Intestinal Simulando o Jejum, versão 2 (FaSSIF-V2) e Fluido Intestinal Simulando o Estado Alimentado, versão 2 (FeSSIF-V2) e diferem da primeira devido à quantidade reduzida de lecitina presente em sua composição (Tabela 4). O FeSSIF-V2 apresenta dois componentes adicionais presentes na fisiologia intestinal, o monoleato de glicerina e o oleato de sódio (Tabela 4). Esses dois componentes são conhecidos por promover

um aumento da solubilidade e da dissolução de fármacos pouco solúveis (JANTRATID; DRESSMAN, 2009). Além disso, tais versões utilizam tampão maleato ao invés dos tampões fosfato (FaSSIF) e acetato (FeSSIF). O tampão maleato apresenta osmolaridade menor que o tampão fosfato, retratando de forma mais adequada o que ocorre *in vivo*; e o ácido maleico é capaz de retardar a rancidez de gorduras e óleos (JANTRATID *et al.*, 2008).

Tabela 4: Composição dos meios de dissolução FaSSIF, FaSSIF-V2, FeSSIF e FeSSIF-V2, utilizados para simular as condições físico-químicas do intestino delgado em jejum e sob alimentação.

Componentes	FaSSIF	FaSSIF- V2	FeSSIF	FeSSIF-V2
Taurocolato de sódio (mM)	3,0	3,0	15,0	10,0
Lecitina (mM)	0,7	0,2	3,7	2,0
Fosfato de sódio di-hidrogenado (mM)	28,6	-	-	-
Cloreto de sódio (mM)	105,8	68,6	173,0	125,5
Ácido maleico (mM)	-	19,1	-	55,0
Hidróxido de sódio (mM)	8,7	34,8	101,0	81,6
Ácido acético			144,0	-
Monoleato de glicerila (mM)			-	5,0
Oleato de Sódio (mM)			-	0,8
pH	6,5	6,5	5,0	5,8
Osmolaridade (mOsm.Kg ⁻¹)	270,0	180,0	635,0	390,0
Capacidade Tamponante (mmol.L ⁻¹ .ΔpH ⁻¹)	10,0	10,0	76,0	25,0

Fonte: Adaptado de JANTRATID *et al.*, 2008; MARQUES; LOEBENBERG; ALMUKAINZI, 2011.

Ambas as versões foram planejadas com base em dados da literatura disponíveis para as concentrações de sais biliares, lecitina e pH no trato gastrointestinal. A capacidade de prever o comportamento *in vivo* dos medicamentos utilizando tais meios de dissolução foi demonstrada em estudos de CIVIV (BOU-CHACRA *et al.*, 2017).

2.6.4 Simulando o intestino grosso humano

O fluido colônico simulado no estado alimentado e não-alimentado, FeSSCOF e FaSSCOF (do inglês, *Fed State Simulating Colonic Fluid* e *Fasted State Simulating Colonic Fluid*) respectivamente, foram propostos por Vertzoni e colaboradores (2010) com objetivo de refletir a composição dos fluidos intestinais presentes no cólon

ascendente humano. As composições de FaSSCOF e FeSSCOF encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5: Composição do fluido colônico simulado do estado alimentado e não-alimentado.

Composição	FaSSCOF	FeSSCOF
Lecitina (mM)	0,3	0,5
Sais biliares (mM)	0,15	0,6
Ácido palmítico (mM)	0,1	0,2
Albumina bovina (mg/mL)	3,0	3,0
Glicose (mg/mL)	-	34,0
Cloreto de sódio (mM)	-	14,0
Tris-aminometano (mg/mL)	5,5	3,7
Ácido maleico (mg/mL)	8,8	3,5
Hidróxido de sódio (mM)	q.s.	q.s.
pH	7,8	6,0
Osmolaridade (mOsm.Kg ⁻¹)	196,0	207,0
Capacidade Tamponante (mmol.L ⁻¹ .ΔpH ⁻¹)	16,0	15,0

Fonte: Adaptado de MARQUES; LOEBENBERG; ALMUKAINZI, 2011; OTSUKA; SHONO; DRESSMAN, 2013.

O estudo realizado por Andreas e colaboradores (2016) comparou o perfil de dissolução do nifedipino em diversos meios de dissolução, divididos em pequenos grupos. O grupo 1 foi testado em tampão fosfato-citrato pH 6,8 com LSS 1%, como recomendado pela USP; o grupo 2 em FaSSGF, FaSSIF e FaSSCOF, simulando o estado em jejum do TGI e; o grupo 3 foi testado em FeSSGF, FeSSIF e FeSSCOF, simulando o estado alimentado do TGI. Os ensaios utilizaram os aparatos 3 e 4 da USP. O autor realizou a CIVIV para comparar o perfil de liberação do fármaco nos estados jejum e alimentado e verificou que através da dissolução em meios biorrelevantes foi possível observar o efeito da alimentação sobre a liberação do fármaco e correlacioná-los com os resultados *in vivo*. Já o perfil de dissolução realizado com o meio recomendado pelo compêndio apresentou forte discrepância com os resultados dos meios biorrelevantes devido à extensa liberação do fármaco provocada pela presença do tensoativo.

2.7 CORRELAÇÃO *IN VITRO-*IN VIVO**

A CIVIV pode ser definida como um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre a propriedade *in vitro* de uma forma farmacêutica de uso oral e a resposta relevante *in vivo*. Usualmente, a propriedade *in vitro* consiste na velocidade de dissolução ou liberação do fármaco de sua forma farmacêutica, enquanto que a resposta *in vivo* é a fração da biodisponibilidade (LU; KIM; PARK, 2011). Trata-se de uma ferramenta útil para acelerar, otimizar e até mesmo reduzir os custos do desenvolvimento de fármacos (GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2015).

2.7.1 Níveis de correlação

Quatro níveis de CIVIV (A, B, C e C múltiplo) são descritos pelo guia da FDA. Estes são baseados na capacidade preditiva da correlação em refletir a relação concentração *versus* tempo do perfil *in vivo* após a administração de uma forma farmacêutica oral (CDER, 1997). O nível de correlação mais relevante, em termos de previsibilidade e aplicação regulatória, é o nível A. No entanto, os níveis B, C e C múltiplo podem ser úteis no desenvolvimento de formulações (GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2015).

O nível A representa uma relação ponto a ponto entre a taxa de dissolução *in vitro* e a taxa de absorção *in vivo* a partir da forma farmacêutica em questão (MODI, 2007; QIU, 2009). Este nível de correlação busca prever todo o perfil *in vivo* a partir da curva de dissolução *in vitro*. A quantidade absorvida é calculada por meio de deconvolução do perfil de dissolução (QIU, 2009).

Quando, no desenvolvimento da correlação, essas curvas não forem sobreponíveis, algumas estratégias podem ser adotadas, como a otimização do ensaio de dissolução por meio da variação das condições experimentais ou o desenvolvimento de modelos matemáticos alternativos para descrição da relação entre as curvas (DUNNE; O'HARA; DEVANE, 1999). Nesta mesma perspectiva do uso dos ensaios de dissolução como substitutos dos estudos *in vivo*, os trabalhos podem ser conduzidos no sentido de desenvolver métodos que mimetizem as condições *in vivo* e estabeleçam uma relação entre dissolução e biodisponibilidade

baseadas, por exemplo, na modelagem computacional da absorção (DICKINSON *et al.*, 2008).

O nível B de correlação utiliza a análise do momento estatístico como princípio. Assim, estabelece uma relação entre o tempo de dissolução médio *in vitro* (TDM_{VITRO}) do produto e o tempo médio de residência *in vivo* (TRM_{VIVO}) no organismo ou tempo médio de dissolução *in vivo*. Para fins de registro, essa correlação não é de grande relevância pois não reflete as concentrações plasmáticas reais (CDER, 1997; QIU, 2009).

A CIVIV de nível C consiste em uma categoria na qual um dos elementos do perfil de dissolução (velocidade de dissolução ou tempo para dissolução de 50% do fármaco a partir da forma farmacêutica) está relacionado a um único parâmetro farmacocinético (C_{max} ou ASC). O nível C representa uma relação de ponto único e não reflete todo o perfil de concentração plasmática e é considerado o nível mais fraco de correlação (QIU, 2009).

O nível C múltiplo de CIVIV relaciona um ou vários parâmetros farmacocinéticos de interesse com a quantidade de fármaco dissolvida em vários momentos ao longo do perfil de dissolução. As correlações de nível C múltiplo podem ser tão úteis quanto as correlações de nível A. No entanto, se uma correlação de nível C múltiplo for possível, há grande possibilidade de uma correlação de nível A também ocorrer (CDER, 1997).

Lue e colaboradores (2008) avaliaram a capacidade dos meios de dissolução biorrelevantes e não-biorrelevantes em prever a absorção *in vivo* de um fármaco em estudo para o tratamento do diabetes mellitus tipo II. O estudo concluiu que o meio de dissolução não biorrelevante, mostrou-se um bom modelo para o desenvolvimento das formulações testadas, porém a CIVIV para este foi inferior aos resultados obtidos de CIVIV para os meios de dissolução biorrelevantes.

Os métodos de CIVIV para fármacos classe II têm se destacado nas pesquisas farmacêuticas. Essa correlação pode ser desenvolvida a partir de metodologias *in silico*, modelos matemáticos computacionais que visam prever os parâmetros farmacocinéticos em função das propriedades físico-químicas dos fármacos com o

objetivo de otimizar o desenvolvimento de uma formulação (HONÓRIO *et al.*, 2013; KOVACEVIC *et al.*, 2008).

2.7.2 Aspecto regulatório

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define a CIVIV como o “estabelecimento de uma relação racional entre as propriedades biológicas, ou parâmetros derivados destas, produzidas por uma forma farmacêutica e suas propriedades ou características físico-químicas” (ANVISA, 2002). As orientações para o estabelecimento de uma CIVIV estão descritas na RE 482 de 19 de março de 2002, entretanto, a resolução não traz especificações dos parâmetros a serem utilizados para tal.

O FDA e a *European Medicine Agency* (EMA) recomendam, para os casos em que a absorção do fármaco é dependente do processo de dissolução, o estudo de, pelo menos, duas formulações com diferentes velocidades de liberação do fármaco para desenvolvimento de uma CIVIV (CDER, 1997; EMA, 2014). Recomenda-se ainda que os conjuntos de dados de dissolução sejam obtidos em diferentes condições de ensaio para avaliar como os fatores da dissolução influenciam na liberação do fármaco (GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.*, 2015). A orientação da EMA requer uma abordagem individualizada de convolução de cada uma das etapas, ao contrário do FDA que utiliza valores médios. Tal exigência leva em conta a variabilidade entre os indivíduos submetidos aos ensaios *in vivo* (CDER, 1997; EMA, 2014).

Em termos regulatórios, a CIVIV é realizada em etapas: (1) obtenção ou seleção das formulações e seus respectivos perfis de dissolução; (2) obtenção das curvas de concentração plasmática *versus* tempo através dos estudos *in vivo* para cada uma das formulações; (3) obtenção da fração absorvida do fármaco por meio de modelos matemáticos e estabelecimento de uma relação matemática entre a fração dissolvida do fármaco *in vitro* e *in vivo* e; (4) validação da CIVIV (EMAMI, 2006; MODI, 2007).

A validação da CIVIV consiste em demonstrar que a predição dos dados *in vivo* a partir da dissolução *in vitro* é precisa e consistente. O FDA recomenda a avaliação do erro percentual (EP) e orienta para a realização de validações interna e externa. A

validação interna pode ser realizada através da medição do EP usando os próprios dados da CIVIV. Ou seja, verifica o quanto o modelo utilizado descreve os dados que desenvolveram a correlação. Pode ser adotado nos casos em que a CIVIV foi realizada usando duas ou mais formulações com diferentes taxas de liberação, desde que o medicamento não seja considerado um medicamento de baixo índice terapêutico. A validação externa requer um conjunto de dados que não foi utilizado no desenvolvimento da CIVIV, como formulações com pequenas alterações no processo de fabricação. O critério determinado pelo FDA admite um EP médio de até 10% (CDER, 1997; QIU, 2009).

2.7.3 Modelos Compartimentais de Distribuição dos Fármacos

Um compartimento consiste em um grupo de tecidos que apresenta velocidade semelhante de distribuição de um fármaco. O número de compartimentos que um fármaco ocupa é determinado a partir da observação do seu perfil de biodisponibilidade (ROSENBAUM, 2017).

O compartimento central consiste no plasma e nos tecidos altamente perfundidos. Por se tratar de uma distribuição muito rápida do fármaco considera-se que a concentração plasmática de fármaco no sangue é igual a concentração do compartimento central. Esse modelo é dito monocompartimental, onde a queda na concentração plasmática do fármaco observada ao longo do tempo, depende apenas da velocidade de eliminação do fármaco (k_{10} ou k_{el}) que segue um processo de 1ª ordem (TOZER & ROWLAND, 2006; ROSENBAUM, 2017).

A partir da observação do decaimento plasmático do fármaco pode ser necessária a adição de mais um compartimento para descrever sua distribuição. O modelo bicompartimental admite um compartimento central e um compartimento periférico rápido. Neste, a distribuição do fármaco ocorre de forma mais lenta do que para o compartimento central. É um modelo caracterizado por uma queda inicial da concentração plasmática no perfil de biodisponibilidade, que corresponde à distribuição para o compartimento periférico, dada por uma constante de velocidade k_{12} . A eliminação é mais lenta, quando comparada a um modelo monocompartimental, visto que há redistribuição do fármaco do compartimento

periférico ao central, dada por uma constante de velocidade k_{21} . A Figura 3 ilustra o perfil de concentração plasmática *versus* tempo para a distribuição bi e tricompartmental de um fármaco após administração intravenosa (ROSENBAUM, 2017).

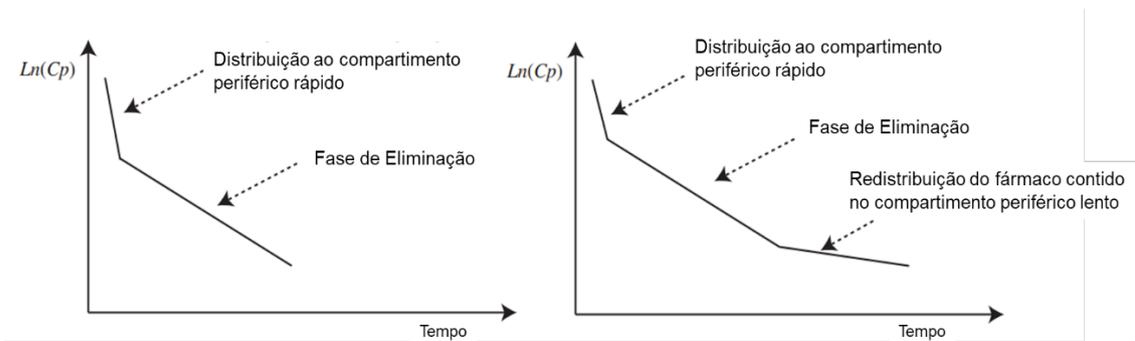


Figura 3: Perfil de concentração plasmática ($\ln C_p$) *versus* tempo ilustrando um fármaco com distribuição a partir de um modelo bicompartimental (esquerda) e tricompartmental (direita).
Fonte: Adaptado de ROSENBAUM, 2017.

Num modelo tricompartmental de distribuição, considera-se que boa parte do fármaco é distribuída aos tecidos pouco perfundidos, como os tecidos adiposo e ósseo. Estes tecidos formam o compartimento periférico lento ou profundo. As constantes de distribuição do fármaco permanecem seguindo um processo de 1ª ordem. Porém, admite-se duas novas constantes, K_{13} e K_{31} , que correspondem a distribuição do fármaco do compartimento central para o compartimento periférico lento e vice-versa, respectivamente (SIMULATION PLUS, 2015; ROSENBAUM, 2017). A Figura 4 apresenta um esquema ilustrando uma distribuição tricompartmental.

No modelo tricompartmental, o fármaco é rapidamente distribuído ao compartimento central e, de forma um pouco mais lenta, ao compartimento periférico rápido. Essa distribuição é percebida pela queda rápida da concentração plasmática no perfil de biodisponibilidade, assim como é observado para o modelo bicompartimental. A partir desse ponto, o processo de decaimento da concentração plasmática é controlado pela eliminação. O terceiro compartimento só é evidenciado depois que uma parte do fármaco já foi eliminada. Os processos de distribuição e redistribuição nos tecidos é mais lento do que as distribuições iniciais. Porém, após

algum tempo decorrido da administração do ativo, a quantidade desse acumulada nesses tecidos é extensa e a redistribuição do mesmo ao compartimento central é que controla a sua eliminação (SIMULATION PLUS, 2015; ROSENBAUM, 2017).

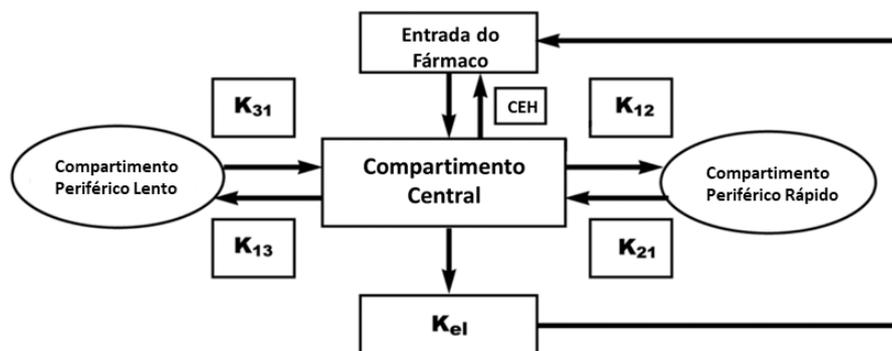


Figura 4: Representação esquemática de uma distribuição tricompartmental. K_{el} : constante de eliminação do fármaco; CEH: circulação entero-hepática.
Fonte: Adaptado de SIMULATION PLUS, 2015.

2.7.4 Modelos matemáticos

Os modelos matemáticos descritos para o estabelecimento das CIVIV dependem se a distribuição dos fármacos se dá de forma mono ou multicompartmental (EMAMI, 2006; QIU, 2009). Ambos são descritos pelos guias de CIVIV da ANVISA, EMA e FDA (ANVISA, 2002; CDER 1997; EMA, 2014) e incluem os métodos de deconvolução e convolução.

Os métodos mais utilizados de deconvolução para estimar a absorção do fármaco por via oral são os métodos de Wagner-Nelson e Loo-Riegelman que utilizam abordagens dependentes do modelo de distribuição cinética e são baseadas no balanço de massas (EMAMI, 2006). A equação de Wagner-Nelson é derivada do modelo cinético de distribuição monocompartmental do fármaco, onde o balanço de massas é dado pelo total de fármaco absorvido pelo organismo $(X_a)_T$ e eliminado em um determinado tempo T . Por derivação, o total de fármaco absorvido até o tempo T $(X_a)_T$ pode ser descrito pela Equação 4 (QIU, 2009).

$$(X_a)_T = VC_T + kV \int_0^T C_T dT \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

V = volume do compartimento central C_T.

C_T = concentração do fármaco no compartimento central no tempo T.

k = constante de eliminação de primeira ordem.

Nos estudos de CIVIV, (X_a)_T é expresso em termos de fração de fármaco absorvida F_a(T) para comparação com a fração do mesmo liberada *in vitro*. Assim, a equação 4 pode ser reescrita na equação 5.

$$F_a(T) = \frac{(X_a)_T}{(X_a)_\infty} = \frac{C_T + k \int_0^T C_T dT}{k \int_0^\infty C_T dT} \quad \text{Equação 5}$$

O método de Wagner-Nelson representa a deconvolução com disposição exponencial única e pode ser aplicado em dados extravasculares, sem a necessidade de estudos que envolvam a administração intravenosa. O perfil de absorção é calculado de forma aparente a partir da constante de eliminação (k) que deve ter origem na verdadeira fase de eliminação do fármaco. Este dado pode ser de difícil mensuração quando são testados fármacos de liberação prolongada ou meia-vida longa (EMAMI, 2006; MOURÃO, 2009; QIU, 2009).

Um dos métodos matemáticos aplicados para modelos de distribuição multicompartmental é a equação de Loo-Riegelman (LOO, RIEGELMAN, 1968; WAGNER, 1983). Como tal modelo representa uma disposição biexponencial do fármaco o balanço de massas considera o total de fármaco no compartimento central e nos compartimentos periféricos em um determinado tempo T. Por derivação, (X_a)_T é determinado pela Equação 6.

$$\frac{(X_a)_T}{VC_T} = C_T + k_{10} \int_0^T C_T dT + k_{12} e^{-k_{21}T} \int_0^T C_T e^{k_{21}T} dT \quad \text{Equação 6}$$

Com base no balanço de massas, uma equação similar pode ser descrita para uma distribuição tricompartmental (Equação 7).

$$\frac{(X_a)_T}{VC_T} = C_T + k_{10} \int_0^T C_T dT + k_{12} e^{-k_{21}T} \int_0^T C_T e^{k_{21}T} dT + k_{13} e^{-k_{31}T} \int_0^T C_T e^{k_{31}T} dT$$

Equação 7

Onde:

k_{12} , k_{21} , k_{13} , k_{31} e k_{10} = constantes da velocidade de distribuição entre os compartimentos

V = volume do compartimento central C_T

C_T = concentração do fármaco no compartimento central no tempo T

Por fim, a convolução é uma técnica modelo-independente utilizada na análise linear dos sistemas. Com base no princípio de superposição em um sistema linear invariável no tempo, uma resposta $C(t)$ pode ser obtida para uma entrada $f(t)$ pela integral representada na equação 8 (QIU, 2009).

$$C(t) = f(\tau) * C_\delta(t) = \int_0^t C_\delta(t - \tau) f(\tau) d\tau$$

Equação 8

Onde:

$C_\delta(t)$ = resposta unitária do sistema podendo ser a concentração plasmática após administração intravenosa ou solução oral

$f(\tau)$ = função de entrada obtida por deconvolução a partir dos dados de absorção do TGI, dissolução gastrointestinal ou ambos

$C(t)$ = concentração plasmática a partir da administração extravascular do fármaco, seja em solução oral ou formulação sólida oral de liberação imediata

Como o sistema admite flexibilidade em função dos parâmetros de entrada a correlação pode representar o processo de dissolução, absorção ou ambos os processos (GILESPIE, 1997; VENG-PEDERSEN *et al.*, 2000).

O modelo matemático a ser escolhido depende dos parâmetros farmacocinéticos do fármaco a ser testado. A resposta *in vivo* pode ser a

concentração plasmática ou a quantidade de fármaco liberada/absorvida. Esta última é obtida através da deconvolução da curva de concentração plasmática *versus* tempo. A utilização de cada um desses parâmetros depende do objetivo do estudo. Quando se utiliza a concentração plasmática como resposta, a relação entre o perfil de liberação *in vitro* e o perfil da concentração plasmática *in vivo* tem relevância clínica muito clara, porque muitos parâmetros farmacocinéticos como C_{max} , T_{max} e ASC são diretamente derivados de tal perfil. Enquanto isso, a utilização dos dados de quantidade de fármaco liberada/absorvida *in vivo* como variável resposta é intuitivamente direta visto que pode ser comparada diretamente com os dados de quantidade de fármaco dissolvida *in vitro* (QIU, 2009).

2.7.5 Predição da biodisponibilidade *in silico*

Os métodos de predição *in silico* são úteis para mensurar parâmetros como C_{max} , T_{max} e ASC (TERSTAPPEN & REGGIANI, 2006). Os dados do perfil de dissolução mais adequado são utilizados a fim de descrever a liberação do fármaco nas diferentes regiões do TGI e, assim, são utilizados os modelos dependentes ou independentes para prever a dissolução e a absorção do fármaco *in vivo*. Na primeira abordagem, o perfil de dissolução é utilizado para modelar a absorção *in vivo*. Isso pode ser feito através de programas que simulam um sistema dinamicamente complexo, como o Stella[®] ou modelos fisiologicamente baseados no trato gastrointestinal (PBPK, do inglês, *physiologically-based pharmacokinetic*) como os GastroPlus[™], PK-Sim[®] ou Simcyp[®]. Nas abordagens de modelo independente, a quantidade dissolvida *in vitro* é comparada diretamente com a quantidade absorvida *in vivo*, calculada a partir da deconvolução dos dados por meio de programas que utilizam dados farmacocinéticos como o WinNonlin[®] ou PCDCON[®] (FOTAKI & VERTZONI, 2010).

2.7.5.1 GastroPlus[™]

O GastroPlus[™] foi desenvolvido para simular a absorção gastrointestinal, ocular, nasal e pulmonar e auxiliar as etapas de desenvolvimento e descoberta de

fármacos. O sistema conta com o modelo de trânsito e absorção compartimental avançado (ACAT, do inglês, *advanced compartmental absorption and transit model*) (SIMULATION PLUS, 2015). Este foi um dos primeiros modelos compartimentalizados direcionados para descrever a fisiologia gastrointestinal. O GastroPlus™ leva em consideração parâmetros físico-químicos e fisiológicos para prever a absorção oral de medicamentos (LAWRENCE & AMIDON, 1999; KAUR *et al.*, 2018).

O modelo ACAT implementado no GastroPlus™ possui cinética modelada por um sistema de equações lineares e não lineares que levam em conta seis estados do fármaco – não liberado, não dissolvido, dissolvido, degradado, metabolizado e absorvido – além de 18 compartimentos fisiológicos – estômago, seis compartimentos do intestino delgado, dois compartimentos do cólon e nove enterócitos – e três estados do fármaco excretado - não liberado, não dissolvido e dissolvido. Este modelo está ilustrado na Figura 5. A quantidade total de material absorvido é a soma das quantidades integradas que são absorvidas em cada um dos compartimentos (SIMULATION PLUS, 2015).

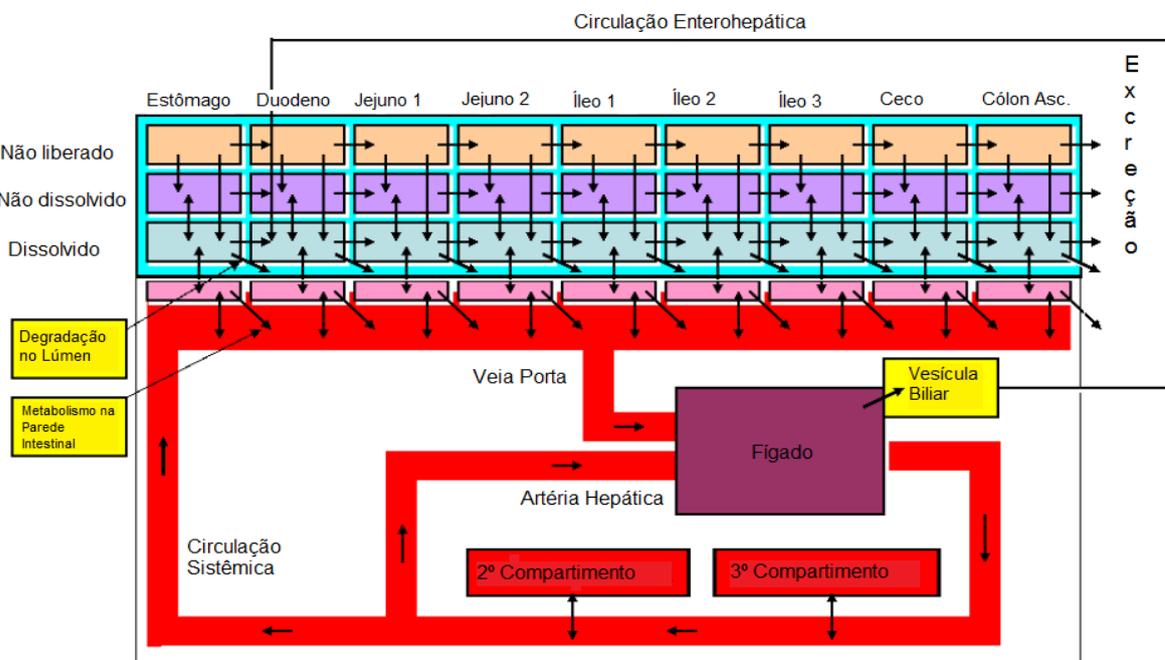


Figura 5: Modelo de trânsito e absorção compartimental avançado (TACA) utilizado no programa GastroPlus™.

Fonte: Adaptado de SIMULATION PLUS, 2015.

Através dos dados farmacocinéticos de um fármaco o GastroPlus™ é capaz de prever sua biodisponibilidade, etapa fundamental no desenvolvimento de medicamentos. Assim, é possível obter o perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo, assim como C_{max} , T_{max} e ASC através da simulação. Através do módulo IVIVCPlus™ é possível realizar CIVIV. O módulo inclui a deconvolução numérica, e os métodos tradicionais de Wagner-Nelson e Loo-Riegelman (SIMULATION PLUS, 2015).

O estudo desenvolvido por Mitra e colaboradores (2019) apresentou dois estudos de caso com o objetivo de destacar a utilização dos modelos PBPK para avaliar a biodisponibilidade de um produto de liberação controlada de classe I e um produto de liberação imediata classe II. Os dados de dissolução, bem como alguns dados físico-químicos do fármaco, foram utilizados como base para simulação da biodisponibilidade no GastroPlus™. Os autores buscaram discutir as aplicações das simulações *in silico* para prever a bioequivalência entre uma formulação teste e referência.

O modelo mostrou-se capaz de prever a farmacocinética observada em humanos com boa correlação, provando sua utilidade nos ensaios de bioequivalência. Para ambos os fármacos testados, a predição *in silico* mostrou-se parte fundamental do desenvolvimento do produto e foi utilizada como elemento-chave para seleção das formulações, onde os dados da dissolução foram utilizados para guiar o desenvolvimento e dar confiança no resultado do estudo de bioequivalência (MITRA *et al.*, 2019).

O trabalho realizado por Honório e colaboradores (2013) avaliou a utilização do GastroPlus™ como uma ferramenta *in silico* para o desenvolvimento de formulações de fármacos pouco solúveis. Os resultados da simulação foram comparados com o estudo de bioequivalência de comprimidos de 600 mg de efavirenz produzidos a partir de IFAs com diferentes características físico-químicas. O método *in silico* também foi utilizado para avaliar o nível de CIVIV adequado ao método de dissolução, considerando diferentes metodologias de dissolução e diferentes modelos de absorção.

O estudo avaliou a solubilidade, o tamanho de partícula e a área superficial dos IFAs para verificar a influência destas características no processo de dissolução. A dissolução dos comprimidos foi avaliada em meio de dissolução LSS em diferentes concentrações conforme determinado pela Farmacopeia Americana (2,0%), Farmacopeia Britânica (1,0%) e pelo método desenvolvido por Farmanguinhos (0,5%). A Farmacopeia Brasileira também recomenda o LSS 1,0% como meio de dissolução para comprimidos de EFV (ANVISA, 2019). Foi verificado que apenas a metodologia de dissolução utilizando LSS 0,5% foi capaz de diferenciar as formulações preparadas a partir dos diferentes lotes de IFA. Os autores escolheram esta metodologia de dissolução para realizar a CIVIV. O GastroPlus™ foi capaz de simular e calcular a biodisponibilidade das formulações e a CIVIV pelo modelo de absorção de Wagner-Nelson, com um coeficiente de correlação de 0,85; e pelo modelo de absorção de Loo-Riegelman, com coeficiente de correlação de 0,93. Assim, por meio de uma metodologia de dissolução adequada, foi possível estabelecer a CIVIV através dos métodos de predição *in silico* (HONÓRIO *et al.*, 2013).

2.8 EFAVIRENZ: SCB CLASSE II

Dados de 2017 mostram que cerca de 36,7 milhões de pessoas em todo o mundo são portadoras do vírus da imunodeficiência humana (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*, HIV) (UNAIDS, 2017). De 1980 a junho de 2018 foram identificados 929.742 casos de Síndrome da Imunodeficiência Humana (do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*, AIDS) no Brasil. No período entre 2000 e 2018, 116.292 gestantes foram identificadas com o vírus HIV. O Brasil registra, anualmente, uma média de 40 mil novos casos de AIDS nos últimos cinco anos (BRASIL, 2018). A principal forma de contenção da multiplicação viral e aumento da expectativa de vida dos pacientes é através do tratamento com antirretrovirais (BRASIL, 2018).

A terapia antirretroviral recomendada pelo Ministério da Saúde para casos em início de tratamento inclui a combinação de 3 fármacos: lamivudina, tenofovir e dolutegravir. As exceções incluem: (1) adultos com outras infecções oportunistas, necessidade de internação hospitalar ou tuberculose disseminada, no qual o dolutegravir é substituído pelo raltegravir; ou (2) co-infecção com tuberculose sem

critérios de gravidade onde o dolutegravir é substituído pelo EFV (BRASIL, 2018). Essa última troca também é feita nos casos de mulheres férteis com acesso precário a contraceptivos e mulheres grávidas devido ao potencial risco de desenvolvimento de anomalias nas terminações nervosas em recém-nascidos tratados com dolutegravir (WHO, 2018).

O EFV é indicado ainda como terceiro antirretroviral alternativo para o tratamento de crianças e adolescentes. Esse fármaco, cuja fórmula estrutural é representada na Figura 6, é um inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa, amplamente utilizado na terapia anti-HIV (BRASIL, 2018). Quando a terapia é administrada corretamente, a contagem do vírus pode atingir níveis abaixo do limite de detecção em cerca de 80% dos casos (BURGER *et al.*, 2006).

A solubilidade do EFV em água é 9,2 µg/mL, com pH 8,7 a 25 °C, sendo incrementada quando o pH é aumentado para valores acima de 9,0. Soluções alcoólicas solubilizam facilmente o EFV: 725 mg/mL, 663 mg/mL e 598 mg/mL para solubilização em metanol, etanol e isopropanol, respectivamente. A molécula apresenta um pK_a de 10,2 e um coeficiente de partição octanol/água de 5,4 (ROWE *et al.*, 1999)

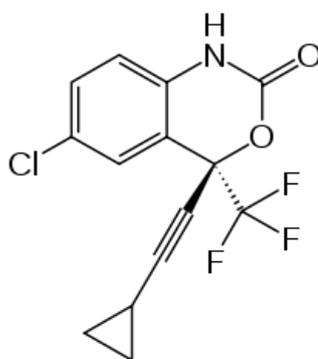


Figura 6: Fórmula estrutural da molécula de efavirenz.
Fonte: DA COSTA *et al.*, 2013

O efavirenz tem farmacocinética com elevado tempo de meia-vida plasmática, com valores entre 52 e 76 horas após administração de dose única, e é metabolizado pelo citocromo P450 2B6 e citocromo P450 3A4 (TCUCHIVA *et al.*, 2004). Após a administração de 600 mg de efavirenz, estima-se que a C_{max} é de 4,07 ± 1,17 µg/mL (PORCHE, 2000). Sua fração de biodisponibilidade oral é de 40 a 45%, com T_{máx} de

2 a 3 horas (FABIANI *et al.*, 2009) e volume de distribuição de 252 L (CSAJKA *et al.*, 2002).

Os estudos de Porche (2000) descrevem que quando o fármaco é administrado junto a uma refeição rica em lipídios sua biodisponibilidade é aumentada em até 50%. Esse resultado concorda com o trabalho apresentado por Kaul e colaboradores (2010) observa-se um aumento de 39% na C_{max} e 22% na ASC, no caso de refeições hiperlipídicas, enquanto frente a uma alimentação hipolipídica, o incremento é de 51% de C_{max} e 17% de ASC. Assim, é recomendada a administração do EFV fora do período de alimentação e, de preferência, antes de dormir (EMA, 2009). Este fármaco apresenta farmacocinética não-linear, ou seja, uma modificação na dose resulta em uma mudança desproporcional nas concentrações plasmáticas do fármaco (CHIAPPETTA *et al.*, 2011; SHARGEL & ANDREWS, 1999). Tal perfil cinético é atribuído à saturação do metabolismo e à alteração do tempo de esvaziamento gástrico, provocando um prolongamento da fase de absorção (CHIAPPETTA *et al.*, 2011).

3 JUSTIFICATIVA

Em 2007, foi oficializado o licenciamento compulsório do efavirenz para uso público não-comercial por meio do Decreto 6108/2007. Tal fato permitiu ao Ministério da Saúde importar versões genéricas do medicamento através de laboratórios pré-qualificados pela OMS. À época o EFV era o medicamento com melhor relação custo-efetividade para o tratamento da AIDS, consumido por 40% dos portadores do vírus no Brasil. A concessão da licença compulsória do EFV previu a importação do fármaco onde o produto foi internamente desenvolvido e registrado junto à ANVISA por Farmanguinhos, com produção iniciada em 2009 (RODRIGUES, SOLER, 2009).

A produção do EFV por Farmanguinhos enfrentou algumas dificuldades em seu percurso. Os primeiros ensaios de bioequivalência realizados apresentaram diferenças significativas entre o medicamento de referência e o medicamento teste (de Farmanguinhos), enquanto os ensaios de equivalência farmacêutica, *in vitro*, mostravam que havia semelhanças. Após estudo pela equipe de desenvolvimento, o procedimento do ensaio de dissolução do medicamento foi modificado, com a redução da concentração de tensoativo utilizada no meio de dissolução, e então foram detectados problemas na formulação proposta, refletindo os resultados encontrados nos testes de bioequivalência (FOLHA DE SÃO PAULO, 2008). Ficou claro, a partir de então, a necessidade de estudos *in vitro* mais preditivos do que ocorre *in vivo*, visto que eles oferecem maior robustez para a realização dos testes da formulação proposta em humanos.

Os meios de dissolução biorrelevantes apresentam composição e características mais similares aos fluidos gastrointestinais e têm sido descritos como capazes de prever, com maior segurança, o comportamento *in vivo* (BOU-CHACRA *et al.*, 2017). Os ensaios de dissolução utilizando esses meios são úteis desde as primeiras fases do desenvolvimento de medicamentos até os últimos estágios pois auxiliam nas estratégias de formulação e no estabelecimento de correlações *in vitro-in vivo*, que levam à redução do número de estudos com experimentação animal (ALMUKAINZI *et al.*, 2014).

Diversos são os estudos que utilizaram meios biorrelevantes para avaliar novas formulações utilizando fármacos classe II do SCB. O trabalho de Deshmukh e colaboradores (2016) utilizou meios compendiais e meios biorrelevantes onde a seleção foi realizada a partir da melhor CIVIV por meio da comparação com estudo animal. O trabalho de Wei & Löbenberg (2006) buscou prever a absorção oral da glibenclamida através de métodos de dissolução biorrelevantes e estudos de simulação para obtenção de uma CIVIV, mostrando que as ferramentas *in vitro* e *in silico* podem potencialmente ser utilizadas como substitutos para os estudos de bioequivalência. Ambos os estudos permitiram a seleção de uma melhor ferramenta *in vitro* para a otimização das formulações, sendo esta, portanto, uma técnica alternativa rápida e simples nos estágios iniciais do desenvolvimento de medicamentos. Entretanto, poucos são os trabalhos na área, em especial com EFV.

Dessa forma, o trabalho em questão apresenta grande valor para os diversos panoramas do âmbito farmacêutico tendo em vista a possibilidade de: (1) auxiliar os fabricantes na tomada de decisão para o ensaio de bioequivalência de seus lotes piloto e modificações pós-registro; (2) fornecer dados acerca dos meios biorrelevantes como preditivos do estudo da bioequivalência para fármacos pouco solúveis em água; (3) fornecer informações técnicas sobre o perfil de dissolução do efavirenz e de que forma pode-se incrementar sua biodisponibilidade; (4) fornecer informações para a implementação de legislações específicas sobre este tipo de ensaio.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade dos meios de dissolução biorrelevantes em prever a biodisponibilidade *in vivo* de comprimidos de efavirenz 600 mg e estabelecer uma correlação *in vitro-in vivo* a partir dos dados do estudo de bioequivalência.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Determinar a solubilidade do efavirenz nos meios de dissolução biorrelevantes e em LSS 0,5%.

b) Avaliar a integridade química em solução do fármaco nos meios biorrelevantes.

c) Avaliar a dissolução de comprimidos de efavirenz 600 mg utilizando meios biorrelevantes e LSS 0,5%.

d) Verificar a adequabilidade do sistema de monitoramento dinâmico *in situ* para avaliação do perfil de dissolução do efavirenz nos meios biorrelevantes e em LSS 0,5%.

e) Avaliar o caráter preditivo dos meios biorrelevantes em relação à biodisponibilidade.

f) Estabelecer uma correlação *in vitro-in vivo* utilizando o GastroPlus™ a partir dos dados do estudo da dissolução com meios biorrelevantes e o perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo dos estudos de bioequivalência.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

5.1.1 Equipamentos

- a) Balança analítica Mettler Toledo modelo XP205.
- b) Dissolutor Distek modelo Evolution 6100.
- c) Sonda de UV Opti-Diss 405 Distek.
- d) Cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) Waters Acquity Arc.
- e) Incubadora orbital IKA modelo KS4000 IC Control.
- f) Potenciômetro MARTE modelo MB10.
- g) Banho ultrassônico Elma modelo S100H Elmasonic.
- h) Membranas filtrantes de celulose reversa 45 µm DISTEK modelo 5720-0275.
- i) Filtros de seringa de poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF) 0,22 µm.
- j) Filtros para cânula do dissolutor em polietileno (PE) 45 µm
- k) Pipeta automática de volume variável.
- l) Seringas descartáveis.

5.1.2 Insumos

- a) Efavirenz – insumo farmacêutico ativo. Por motivos de confidencialidade, o nome do fabricante não será divulgado.
- b) Comprimidos revestidos de efavirenz 600 mg lote 180150151 / Farmanguinhos-FIOCRUZ.
- c) Meio de dissolução FaSSGF/FaSSIF/FeSSIF lote FFF-0218-B / Biorelevant.
- d) Meio de dissolução FaSSIF-V2 lote V2FAS-0318-A / Biorelevant.
- e) Meio de dissolução FeSSIF-V2 lote V2FES-0118-A / Biorelevant.
- f) Água purificada obtida em equipamento de osmose reversa MilliQ Elix Inside Merck.
- g) Lauril sulfato de sódio (C₁₂H₂₅NaO₄S) (lt.72152).

- h) Fosfato de potássio monobásico mono-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Spectrum/1CD0586).
- i) Hidróxido de sódio (NaOH) (Sigma Aldrich/SLBQ9677V).
- j) Ácido acético glacial (CH_3COOH) (Merck/K45178063).
- k) Ácido clorídrico (HCl) (Merck/K46783017).
- l) Ácido maleico ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$) (Sigma Aldich/ SLBT3832).
- m) Cloreto de sódio (NaCl) (Merck/K40001004).

5.2 MÉTODOS

Os métodos de preparo das soluções descritos a seguir foram realizados conforme a Farmacopeia Brasileira (2019) e a recomendação do fabricante dos meios biorrelevantes (BIORELEVANT).

5.2.1 Preparo das soluções

- a) Solução NaOH 0,1 M.

Foram pesados 4,0 g de NaOH e dissolvidos em 900 mL de água purificada, ajustando o volume final em 1000 mL em balão volumétrico.

- b) Solução NaOH 1,0 M.

Foram pesados 40,0 g de NaOH e dissolvidos em 900 mL de água purificada, ajustando o volume final em 1000 mL em balão volumétrico.

- c) Solução HCl 1,0 M.

Em bécher, foram adicionados 500 mL de água purificada, seguidos de 82,44 mL de HCl P.A. A solução foi transferida para balão volumétrico e seu volume final ajustado em 1000 mL.

- d) Tampão fosfato pH 6,5.

Foram pesados 0,42 g de NaOH, 3,95 g de NaH_2PO_4 e 6,19 g de NaCl e dissolvidos em 900 mL de água purificada. O pH foi ajustado para 6,5 com solução

de NaOH 1 M ou HCl 1 M e o volume final foi adequado para 1000 mL, em balão volumétrico, utilizando água purificada.

e) Tampão acetato pH 5,0.

Foram pesados 4,04 g de NaOH e 11,87 g de NaCl e dissolvidos em 400 mL de água purificada e acrescidos 8,24 g de ácido acético glacial. Em seguida, 500 mL de água purificada foram adicionados e o pH final da solução foi ajustado para 5,0 utilizando solução de NaOH 1 M ou HCl 1 M. O volume final foi de 1000 mL, adequado em balão volumétrico, com água purificada.

f) Tampão maleato pH 6,5.

Foram pesados 1,39 g NaOH; 2,22 g de ácido maleico; e 4,01 g de NaCl e dissolvidos em 900 mL de água purificada. O pH da solução tampão foi ajustado a 6,5 utilizando solução de NaOH 1 M ou HCl 1 M e seu volume final foi adequado para 1000 mL, em balão volumétrico, utilizando água purificada.

g) Tampão maleato pH 5,8.

Foram pesados 3,27 g de NaOH, 6,39 g de ácido maleico e 7,33 g de NaCl e dissolvidos em 900 mL de água purificada. O pH da solução tampão foi ajustado a 5,8 utilizando NaOH 1 M ou HCl 1 M e seu o volume final foi adequado para 1000 mL, em balão volumétrico, utilizando água purificada.

5.2.2 Preparo dos meios de dissolução

a) Lauril sulfato de sódio 0,5%

Foram pesados 5,00 g de LSS e dissolvidos em 900 mL de água purificada. A dispersão foi agitada manualmente até que todo o pó estivesse completamente solubilizado. O volume final foi ajustado para 1000 mL utilizando água purificada.

b) FaSSIF

Foram pesados 2,24 g de FaSSIF e dissolvidos em 500mL de tampão fosfato (pH 6,5). A dispersão foi agitada manualmente até que todo o pó estivesse

completamente solubilizado. O volume final foi ajustado para 1000 mL utilizando tampão fosfato a temperatura ambiente. A solução permaneceu em repouso por 4h antes de sua utilização.

c) FeSSIF

Foram pesados 11,20 g de FeSSIF e dissolvidos em 500 mL de tampão acetato (pH 5,0). A dispersão foi agitada manualmente até que todo o pó esteja completamente solubilizado. O volume final foi ajustado para 1000 mL utilizando tampão acetato a temperatura ambiente.

d) FaSSIF-V2

Foram pesados 1,79 g de FaSSIF-V2 e dissolvidos em 500 mL de tampão maleato (pH 6,5). A dispersão foi agitada manualmente até que todo o pó estivesse completamente solubilizado. O volume final foi ajustado para 1000 mL utilizando tampão maleato (pH 6,5) a temperatura ambiente. A solução permaneceu em repouso por 1 h antes de sua utilização.

e) FeSSIF-V2

Foram pesados 9,76 g de FESSIF-V2 e dissolvidos em 500 mL de tampão maleato (pH 5,8). A dispersão foi agitada manualmente até que todo o pó estivesse completamente solubilizado. O volume final foi ajustado para 1000 mL utilizando tampão fumarato (pH 5,8) a temperatura ambiente. A solução permaneceu em repouso por 1 h antes de sua utilização.

5.2.3 Curva analítica

As análises foram realizadas através de quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de UV. Os parâmetros operacionais do método estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2: Parâmetros operacionais para quantificação do EFV por CLAE/UV.

Equipamento	Waters UHPLC Acquity Arc
Fase móvel	Acetonitrila:Água (70:30)
Fase estacionária	Coluna C 18 150 mm x 4,6 µm; 10 µm
Diluyente	Acetonitrila:Água (50:50)
Fluxo	1,0 mL/min
Volume injetado	20 µL
Detector	UV – Waters, PDA 2998 – 250nm
Filtro	Membrana PVDF 0,22 µm

Uma solução mãe de 0,8 mg/mL de efavirenz em metanol foi preparada pela pesagem quantitativa de 20 mg de efavirenz diluídos em 25,00 mL de metanol. Foram realizadas diluições sucessivas nas concentrações de 1,2; 3,6; 8,0; 24,0; 56,0; 80,0; 140,0 e 160,0 µg/mL, utilizando o acetonitrila:água (1:1) como diluyente. A avaliação estatística dos parâmetros de linearidade da curva analítica foi realizada através dos seguintes métodos: teste F, teste do intercepto, avaliação da correlação de Pearson, teste de normalidade dos resíduos, teste de homocedasticidade das variâncias, verificação de valores extremos (*outliers*) e teste de independência de observações, realizados pelo programa ActionStat®, versão 3.6.

5.2.4 Determinação da solubilidade

A solubilidade foi determinada pelo método de *shake-flask*, utilizando plataforma de agitação orbital e temperatura controlada com base nas recomendações da RDC nº 31 de 2010 (ANVISA, 2010). Esse método também é adotado pelas legislações internacionais (EMA, 2010; CDER, 2015; WHO, 2015). Em triplicata, foi adicionado um excesso de efavirenz a um erlenmeyer contendo 50 mL de cada um dos meios de dissolução testados (LSS 0,5%, FaSSIF, FeSSIF, FaSSIF-V2, FeSSIF-V2), de modo a saturá-los. As amostras foram incubadas sob agitação em incubadora orbital com controle de temperatura, 37 °C ± 0.5 °C, a 250 rpm até estabilização das leituras, com amostragem em 2, 4, 6 e 24 horas. Uma alíquota de 1 mL foi retirada de cada amostra e filtrada em membrana de PVDF 0,22 µm. A quantificação foi realizada por CLAE/UV.

As concentrações de saturação foram determinadas com base na curva analítica desenvolvida. Os resultados obtidos foram avaliados mediante teste *one-way* ANOVA *post hoc* Tukey comparando os resultados obtidos a um nível de significância de 95%.

5.2.5 Avaliação da integridade química em solução do fármaco

Conforme indicado pelo Guia nº 14/2018, o método analítico utilizado deve ser permitir a quantificação do IFA na presença de seus possíveis produtos de degradação (ANVISA, 2018). Assim, o efavirenz foi avaliado em solução na presença dos meios de dissolução testados de modo que sua integridade química fosse evidenciada frente ao método analítico utilizado.

A partir dos resultados do estudo de solubilidade foram preparadas soluções de efavirenz em cada um dos meios de dissolução testados. As soluções foram aquecidas a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ e foram retiradas alíquotas de 5 mL para avaliação do tempo zero. Em seguida, levadas à agitação orbital a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 3h, tempo compatível com o ensaio de dissolução. Após decorrido o tempo estabelecido, novas amostras de 5 mL foram retiradas para avaliação da concentração de efavirenz no tempo de 3h. Ambas as amostras foram quantificadas por CLAE/UV e calculado o percentual de recuperação do fármaco entre as amostras obtidas.

5.2.6 Determinação do perfil de dissolução

5.2.6.1 Escolha do método de quantificação

O estudo da dissolução de comprimidos de efavirenz foi avaliado por dois métodos de quantificação: utilizando sonda de UV *in situ* e através da coleta de amostras com quantificação por CLAE/UV. Os métodos descritos foram baseados no método validado por Farmanguinhos para a dissolução de comprimidos de efavirenz 600 mg (FARMANGUINHOS/FIOCRUZ, 2012).

Os meios de dissolução LSS 0,5%, FaSSIF, FaSSIF-V2, FeSSIF e FeSSIF-V2 foram degaseificados em banho ultrassônico sob vácuo e, em seguida, cuidadosamente vertidos em cubas do dissolutor. O total de 500 mL foi utilizado para os meios que simulam o jejum, enquanto 900 mL foram utilizados para os meios que simulam o estado alimentado do TGI e para o LSS 0,5%, conforme indicado pelo fabricante dos meios de dissolução biorrelevantes. Os experimentos foram realizados em triplicata utilizando aparato 2 de dissolução, a $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ e agitação de 50 rpm, conforme indicado pelo Guia nº 14/2018 (ANVISA, 2018). Depois de atingida a temperatura de interesse, um comprimido de efavirenz 600 mg foi adicionado em cada uma das cubas. O tempo total do experimento foi de 2,5 horas para os ensaios utilizando a quantificação por sonda de UV *in situ* e 3 horas para os ensaios com quantificação por CLAE/UV.

Os ensaios de dissolução foram quantificados através de sonda de quantificação por UV *in situ* utilizaram como controle positivo uma solução padrão de EFV diluída no respectivo meio biorrelevante, em concentração de acordo com a solubilidade máxima do fármaco no respectivo meio. Uma suspensão contendo os excipientes da formulação no respectivo meio de dissolução testado foi utilizada como branco.

Para a quantificação por CLAE/UV foram retiradas alíquotas de 5,0 mL após decorridos 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos da dissolução, sem reposição de meio. As alíquotas foram seguidamente filtradas em membranas de PE 45 µm e PVDF 0,22 µm. A quantificação foi realizada por CLAE/UV, mediante diluição adequada e utilizando a fase móvel descrita no item 5.2.3 para diluição da amostra.

5.2.7 Comparação dos perfis de dissolução

A comparação entre os perfis foi realizada pelo Método Independente de Modelos através do cálculo do fator de semelhança (F2), Equação 9, além de realização de teste de análise de variâncias (ANOVA) de dois fatores com pós teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%. Para a comparação dos métodos de detecção utilizados foi realizada ANOVA de dois fatores *post hoc* Sidak, devido ao menor conjunto de dados.

A eficiência de dissolução (ED) dos perfis dos comprimidos de efavirenz foi determinada através do cálculo da ASC da dissolução pelo método dos trapezoides, proposto inicialmente por Khan e Rhodes (1975) conforme a Equação 10. Os valores de ED foram comparados através *one-way ANOVA post hoc* Tukey, com intervalo de confiança de 95%. Os programas Microsoft Excel® 365, DD Solver® e GraphPad Prism® 6 foram utilizados para análise dos resultados.

$$f2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (Rt - Tt)^2 \right]^{-0,5} \right\} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

$$ED(\%) = \frac{ASC_{0-Tfinal}}{ASC_{máx}} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

Onde:

n = número de pontos.

Rt = dissolução do medicamento de referência no tempo t.

Tt = dissolução do medicamento teste no tempo t.

5.3 CORRELAÇÃO *IN VITRO- IN VIVO*

5.3.1 Estudo de bioequivalência

Os dados do estudo de bioequivalência foram fornecidos por Farmanguinhos/FIOCRUZ. O referido estudo foi realizado na Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG), pertencente à Ação Social Franciscana – Casa Nossa Senhora da Paz no ano de 2008. O estudo foi realizado com 14 voluntários saudáveis, incluindo homens e mulheres, na faixa etária de 18 a 45 anos, em jejum. O peso médio corporal dos voluntários foi de 64,72 kg. A última coleta foi realizada após 192 horas da administração do medicamento. Na administração, foi ingerido um volume de 200 mL de água para um comprimido de 600 mg de efavirenz. Os lotes do medicamento de referência utilizados no estudo foram aqueles disponíveis para comercialização a época de sua realização. As coletas foram realizadas após administração nos intervalos de: 0,5, 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12; 24; 36; 48; 60; 72; 84; 96; 108; 120; 132; 144; 156; 168; 180 e 192 h.

5.3.2 Simulação do comportamento gastrointestinal utilizando GastroPlus™

Antes de estabelecer a CIVIV, a biodisponibilidade do EFV foi simulada no programa GastroPlus™ (versão 9.5, *Simulation Plus Inc., Lancaster, California, USA*). A descrição detalhada do passo-a-passo para inserção dos dados já foi descrita anteriormente na literatura (HONÓRIO *et al.*, 2012). De maneira resumida, o programa apresenta três módulos de entrada: composto, fisiologia e farmacocinética (*Compound, Physiology, Pharmacokinetics*). Neste estudo, os dados de solubilidade foram determinados experimentalmente, os demais dados foram retirados do banco de dados do próprio programa e da literatura (HONÓRIO *et al.*, 2013). O coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) utilizado na simulação da biodisponibilidade foi obtido por meio de experimentos *in vitro* com monocamada de células Caco-2 (TAKANO *et al.*, 2006). A Tabela 6 apresenta os dados de entrada relacionados ao fármaco utilizados para simular a biodisponibilidade. Como a formulação em questão é de liberação imediata a opção “IR: Tablet” foi selecionada. Os dados de solubilidade foram inseridos utilizando a opção solubilidade *versus* pH (HONÓRIO, 2012). O Anexo II apresenta os dados da fisiologia humana utilizados como entrada para a simulação dos parâmetros farmacocinéticos da absorção do EFV em jejum e sob alimentação, fornecidos pela base de dados do programa.

No módulo *Compound* foram inseridos os dados físico-químicos do fármaco (WEI, LOBENBERG, 2006; HONÓRIO *et al.*, 2013). Estes foram utilizados para calcular a concentração do EFV em cada compartimento do TGI. O método *in silico* calculou a fração absorvida baseado no modelo ACAT considerando a influência de cada parâmetro presente em cada um dos compartimentos fisiológicos (WEI & LOBENBERG, 2006; SIMULATION PLUS, 2015).

No módulo *Physiology* foi selecionado o modelo ASF Opt logD Model AS/V, que ajusta os fatores da escala de absorção de acordo com as mudanças fisiológicas entre os compartimentos intestinais. Os demais parâmetros foram fixados em valores padrões para fisiologia humana, no estado de jejum, o mesmo que o ensaio de

Tabela 6: Parâmetros relacionados ao fármaco utilizados para a simulação da biodisponibilidade de comprimidos de efavirenz 600 mg utilizando GastroPlus™.

Parâmetros	
Massa molar (g/mol) ^a	315,67
Log P ^a	5,4
pK _a ^a	10,2
Dose (mg)	600
P _{app} (cm/s x 10 ⁻⁵) ^a	8,92
Relação sangue/plasma ^a	0,74
Tempo de precipitação (s) ^b	900
Coeficiente de difusão ^b	0,7473
Densidade de partícula (g/mL) ^b	1,2
Fisiologia ^b	Jejum/Alimentado
Modelo ASF ^b	AS/V 6.1
Peso corporal (kg) ^c	64,72
Volume de distribuição (L/kg) ^c	1,56
Depuração (L/h) ^c	2,65
Tempo de meia-vida (h) ^c	266,63
Volume de dose (mL) ^c	200

P_{app}: coeficiente de permeabilidade aparente; AFS: fator de escada de absorção; a: TAKANO, 2006; b: banco de dados do GastroPlus™; c: parâmetros derivados do estudo clínico de bioequivalência. Fonte: Adaptado de HONORIO *et al.*, 2013.

bioequivalência foi realizado, e no estado alimentado. Por meio do módulo PKPlus, os dados do estudo de bioequivalência foram avaliados quanto ao modelo farmacocinético: 1, 2 ou 3 compartimentos, onde o programa indica o melhor ajuste e expressa através do valor de AIC do modelo escolhido. O resultado foi importado para o módulo *Pharmacokinetics* para que os dados de concentração plasmática *versus* tempo fossem simulados. Os resultados da simulação foram comparados com os dados experimentais com base no manual do programa (SIMULATION PLUS, 2015).

5.3.3 Correlação *in vitro-in vivo*

Uma CIVIV de nível A foi realizada através do método de deconvolução. Na primeira etapa determinou-se a fração absorvida do fármaco utilizando os dados de biodisponibilidade, através do modelo que apresentou se ajustou aos dados do estudo de bioequivalência (modelo de Loo-Riegelman: três compartimentos). Na segunda etapa, os dados da fração absorvida foram correlacionados com a fração dissolvida, obtida no estudo da dissolução.

A correlação foi realizada pelo módulo *IVIVCPlus*. Ao habilitar o módulo *IVIVCPlus* existem 4 opções: *in vitro*, *in vivo*, *IVIVC* e convolução. Na primeira opção foram inseridos os dados do estudo *in vitro*, representados pela dissolução em cada um dos meios testados. Na opção seguinte foram inseridos os valores do perfil da curva de concentração plasmática *versus* tempo derivados do estudo de bioequivalência. Na opção *IVIVC* é realizada a deconvolução dos dados onde o programa verifica o melhor ajuste de correlação entre as opções disponíveis (linear, potencial, polinomial de 2ª ordem ou polinomial de 3ª ordem) com base nos valores de r^2 . Nesta fase é estabelecida a relação entre os dados *in vitro* e os dados *in vivo*.

A última etapa consiste em realizar a convolução que apresenta a correlação entre a curva de concentração plasmática *versus* tempo determinada experimentalmente pelo estudo de bioequivalência e a curva calculada a partir dos dados da dissolução *in vitro*. Esta etapa consiste na validação estatística da correlação obtida anteriormente onde o programa realiza o cálculo do erro percentual entre os valores observados e obtidos para C_{max} e ASC_{0-t} e exibe a função de correlação.

5.3.4 Avaliação estatística

A correlação foi expressa em termos do coeficiente de regressão linear, automaticamente gerado pelo programa. A porcentagem do erro de predição (%EP) foi estimada utilizando a Equação 11.

$$\%EP = \frac{OBS - PRED}{OBS} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

Onde:

%EP: porcentagem do erro de predição.

OBS: parâmetros observados.

PRED: parâmetros simulados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE

O estudo de solubilidade foi realizado para avaliação do comportamento do efavirenz frente aos diferentes meios de dissolução e para verificação da possibilidade de realização destes estudos sob condição *sink*. A solubilidade do fármaco foi determinada conforme descrito no item 5.2.4 e expressa através da concentração de saturação após 24 h. O cálculo da quantidade de EFV foi determinado com base na curva analítica presente no Anexo I. Os resultados da determinação de solubilidade estão apresentados na Tabela 7. O perfil de solubilidade, apresentado na Figura 7, evidencia que após 6 h do ensaio de solubilidade não houve alteração da concentração de efavirenz nos meios de dissolução.

Tabela 7: Solubilidade do efavirenz nos diferentes meios de dissolução testados. Os dados são apresentados como média e desvio padrão de três replicatas independentes.

Meio de Dissolução	Concentração de EFV (mg/mL)	pH início	pH final
FaSSIF	0,182 ± 0,001	6,5	6,7
FaSSIF – V2	0,036 ± 0,002	6,5	6,8
FeSSIF	0,847 ± 0,002	5,0	5,3
FeSSIF – V2	0,822 ± 0,035	5,8	5,9
LSS 0,5%	0,789 ± 0,023	8,2	8,6

A análise estatística mostrou que não há diferenças na solubilidade entre os meios LSS 0,5%, FeSSIF e FeSSIF-V2. As diferenças na solubilidade encontradas, entre ambas as versões de FaSSIF e FeSSIF podem ser justificadas pela concentração do sal biliar taurocolato de sódio e do fosfolípido lecitina presentes na composição dos meios biorrelevantes. A variação na concentração destes nos meios biorrelevantes alteram as propriedades tensoativas e de formação de micelas influenciando tanto a solubilidade quanto a dissolução dos fármacos (LÖBENBERG; AMIDON, 2000). Assim, a quantidade de tensoativos apresenta suma importância na absorção intestinal dos fármacos de classe II, como o efavirenz, que tem como etapa limitante para a absorção, a dissolução (AMIDON, 2011).

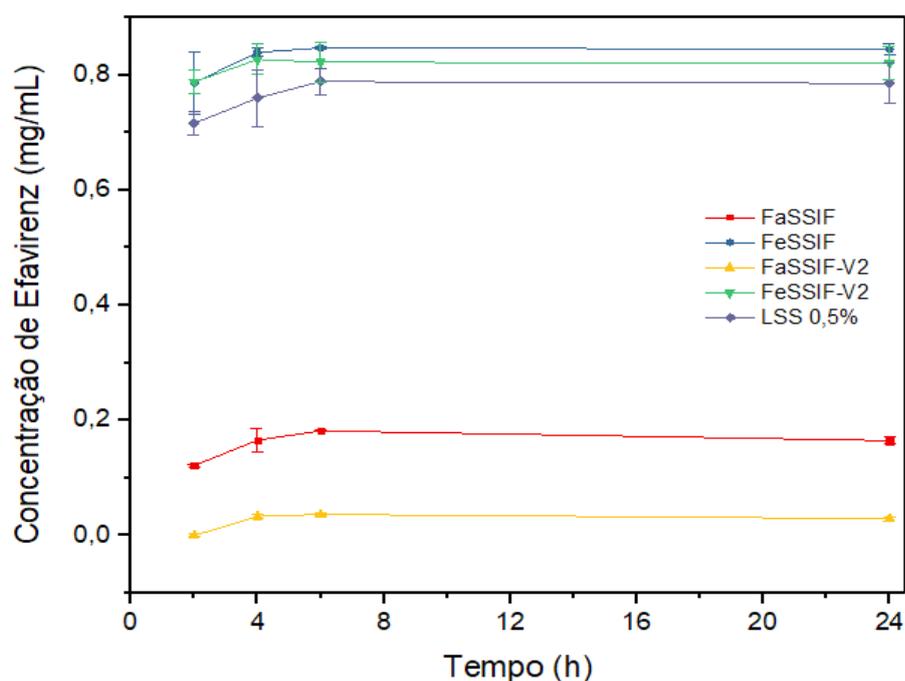


Figura 7: Perfil de solubilidade do efavirenz nos meios de dissolução testados. Os dados são apresentados como média e desvio padrão de três replicatas independentes.

No estudo de solubilidade foi realizada a avaliação do pH dos meios de dissolução no início e ao final do teste, onde ambos se mantiveram estáveis durante o ensaio, evidenciando que os sistemas de tamponamento utilizados foram efetivos na manutenção do pH dos meios testados. Ambos os valores de pH utilizados encontram-se abaixo do pKa do EFV (10,2). Por isso, conforme mostrado pela equação 1, tem-se que, nesses meios de dissolução, o fármaco está em seu estado não ionizado. Para o efavirenz, o pH dos meios testados não é um fator que influencia a solubilidade e a dissolução do fármaco, visto que de acordo com a Tabela 1, o trato gastrointestinal não atinge valores de pH mais altos que seu pKa.

Os dados de solubilidade concordam com os dados obtidos por Bedor (2011) e Takano e colaboradores (2006) em que as concentrações de saturação do EFV em FaSSIF foram de $0,153 \pm 1,75$ mg/mL e $0,194 \pm 0,007$ mg/mL, respectivamente, contra $0,182 \pm 0,001$ mg/mL neste estudo (Tabela 7). A concentração de saturação desse fármaco obtida em FeSSIF concorda com os dados de Lavra, Santana e Ré (2017) que mostraram $0,8619 \pm 2,94$ mg/mL de EFV solubilizados, contra $0,847 \pm 0,002$ mg/mL neste estudo (Tabela 7).

Os sistemas micelares são capazes de aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade *in vivo* (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2005; BOU-CHACRA *et al.*, 2017). Kaukonen e colaboradores (2004) compararam a solubilidade do danazol, um fármaco de classe II, em soluções tampão e soluções micelares utilizando diferentes lipídeos, observando o impacto destes compostos na solubilização daqueles insumos. Concluiu-se que as soluções compostas por micelas mistas, onde os triglicerídeos estão hidrolisados, apresentaram maior capacidade de solubilização do que micelas puras ou soluções tampão.

Em outro estudo, a solubilidade de diversos fármacos pouco solúveis em meios biorrelevantes (FaSSIF e FeSSIF) foi avaliada visando entender os fatores que afetam a sua solubilização por micelas mistas. Assim como no estudo anterior, foi observado aumento da solubilidade dos fármacos em FeSSIF quando comparado a FaSSIF. A capacidade aparente de solubilização dos fármacos foi caracterizada pela inclusão do fármaco nos sistemas micelares, que depende tanto do pH quanto da concentração de tensoativos no meio (SCHWEBEL *et al.*, 2011). Dessa forma, tanto o trabalho realizado por Schwebel e colaboradores (2011) quanto aquele apresentado por Kaukonen e colaboradores (2004), assim como este estudo, mostraram que há um aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em FeSSIF quando comparado a FaSSIF.

No presente estudo, o incremento da solubilidade dado por FaSSIF em relação a FaSSIF-V2 foi de 5 vezes (Tabela 7), refletindo a importância dos fosfolipídeos na solubilização do EFV. O estudo realizado por Shono e colaboradores (2009) avaliou a dissolução de celecoxibe, um fármaco também da classe II, em meios biorrelevantes para predição do efeito da alimentação utilizando o modelo farmacocinético baseado na fisiologia. O estudo da solubilidade mostrou um aumento frente aos meios FaSSIF e FeSSIF, devido ao efeito de solubilização por micelas mistas, onde a solubilidade em FaSSIF foi três vezes maior do que em FaSSIF-V2, concordando, portanto, com os dados deste trabalho.

Ainda sobre o estudo realizado por Shono e colaboradores (2009), a comparação entre FeSSIF e FeSSIF-V2 não mostrou diferenças significativas, assim como ocorreu para o EFV neste estudo. Isso corrobora a teoria de que a lecitina tem papel fundamental na solubilização de fármacos desta classe, uma vez que no FeSSIF-V2 o efeito dos produtos de lipólise (monooleato de glicerila e oleato de sódio), aparentemente, compensam o efeito da redução da concentração de taurocolato de sódio. Tal fato explicaria a maior solubilidade nos meios alimentados e a não diferença entre eles; além disso, explica as diferenças em relação a solubilidade nas versões de FaSSIF.

A discussão referente à solubilização dos fármacos tem relação direta com um parâmetro crítico no planejamento de ensaios de dissolução, que é a condição *sink*. Esta consiste em manter o fármaco a uma concentração de menos de 10% da concentração de saturação do mesmo no meio de dissolução ou “no mínimo três vezes o volume de meio necessário para se obter uma solução saturada do IFA, considerando sua maior dose” (ANVISA, 2018). A Tabela 8 apresenta os valores necessários para que a condição *sink* seja atingida nos ensaios de dissolução.

Tabela 8: Valores para condição *sink* da dissolução de comprimidos de efavirenz 600 mg nos meios de dissolução testados.

Meio de Dissolução	Solubilidade (mg/mL)	Q* (mg)	VN** (L)	VCs*** (L)	Razão (L/VN) [@]
FaSSIF	0,182 ± 0,001	91,0	3,29	9,89	0,15
FaSSIF-V2	0,036 ± 0,002	18,0	16,67	50,00	0,03
FeSSIF	0,847 ± 0,002	762,3	0,71	2,12	1,27
FeSSIF-V2	0,822 ± 0,035	739,8	0,73	2,19	1,23
LSS 0,5%	0,789 ± 0,023	710,1	0,76	2,28	1,18

*Q = quantidade de IFA dissolvida em 500 ou 900 mL de meio de dissolução (solubilidade x vol. meio de dissolução). Para FaSSIF e FaSSIF-V2 = 500 mL; para FeSSIF, FeSSIF-V2, LSS 0,5%.

**VN = volume necessário para dissolver um comprimido de 600 mg.

***VCs = volume necessário para satisfazer a condição *sink* (3 x VN).

@ = volume de meio de dissolução / VN.

Considerando um volume de dissolução de 900 mL e um comprimido de 600 mg de EFV, como ocorre nos ensaios de dissolução para os meios biorrelevantes que simulam o estado alimentado do intestino, a condição *sink* não é obtida em nenhum

dos que foram testados. Já em FaSSIF e FaSSIF-V2, a concentração de fármaco durante a dissolução encontra-se acima da concentração de saturação. Para o efavirenz, neste estudo, uma dose de 600 mg necessitaria, no caso dos ensaios simulando o intestino em jejum, de um volume de 3,29 L, excedendo o volume dos fluidos intestinais (JANTRATID; DRESSMAN, 2009). Entretanto, no trabalho de Bedor (2011), comparou o perfil de dissolução do efavirenz em FaSSIF e FeSSIF frente aos dados *in vivo* e concluiu que, nesse caso, para a observação discriminativa do que ocorre *in vivo*, foi necessária a avaliação *in vitro* com meios de dissolução em condições não *sink*. Assim, esses fatos indicam que a solubilidade do fármaco é um fator limitante para a absorção e para sua biodisponibilidade.

A realização dos ensaios de dissolução fora da condição *sink* foi relatado para outros fármacos de classe II pelo SCB. No trabalho de Lobenberg e Amidon (2000), observou-se que a solubilidade da digoxina e griseofulvina foi de 0,024 mg/mL e 0,015 mg/mL, respectivamente. Conseqüentemente, o volume necessário para dissolver a digoxina em sua dose de administração é de cerca de 20 mL, já a griseofulvina necessitaria de 33,3 L.

6.2 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE QUÍMICA EM SOLUÇÃO DO EFAVIRENZ

Em relação à manutenção das propriedades físico-químicas do fármaco frente aos meios de dissolução testados, os resultados de recuperação do fármaco após 3h de exposição aos meios estão apresentados na Tabela 9. Tais resultados evidenciam a manutenção das características do fármaco frente à complexidade dos meios de dissolução biorrelevantes.

Tabela 9: Resultado do ensaio de recuperação do efavirenz nos meios de dissolução testados para avaliação da integridade química do fármaco em solução.

Meio de Dissolução	Taxa de Recuperação	Desvio Padrão	pH início	pH final
FaSSIF	98,8%	0,052	6,5	6,7
FaSSIF – V2	101,4%	0,066	6,5	6,7
FeSSIF	100,7%	0,013	5,0	5,3
FeSSIF – V2	119,8%	0,177	5,8	6,0
LSS 0,5%	103,1%	0,052	8,2	8,6

A mesma metodologia foi utilizada para avaliar a integridade química de atorvastatina e fenofibrato para o desenvolvimento de um método de dissolução biorrelevante por Amonulu e colaboradores (2019), no qual as amostras contendo os fármacos em solução nos meios biorrelevantes em FaSSIF e FeSSIF foram avaliadas após 48h. Da mesma forma, não houve alteração da concentração dos fármacos testados, tal qual evidenciado para o efavirenz por este estudo.

6.3 PERFIL DE DISSOLUÇÃO COM QUANTIFICAÇÃO UTILIZANDO SONDA UV

A Figura 8 apresenta o perfil de dissolução de comprimidos de efavirenz 600 mg nos meios de dissolução testados, utilizando como método de detecção sonda UV *in situ*, os dados podem ser consultados no Anexo III. O cálculo da quantidade de EFV foi determinado com base na leitura de solução de padrão de EFV no respectivo meio de dissolução. Ambos os perfis apresentaram desvio padrão relativo inferior a 20% nos primeiros pontos de coleta e inferior a 10% nos demais pontos, conforme Anexo III, conforme recomendado pela RDC n. 31/2010.

A quantidade dissolvida na versão 2 é menor do que na primeira versão dos meios FaSSIF e FeSSIF, mesmo eles representando ambientes fisiológicos iguais e, no caso do FeSSIF, solubilidades similares (Figura 7). Estas versões utilizam como sistema tamponante o tampão maleato com pH 6,5 e pH 5,8, respectivamente. De acordo com Mauger (2017) este sistema tamponante apresenta cromóforos que podem interferir nas quantificações no UV, além de interagir de forma irreversível com algumas proteínas, o que limita sua utilização para a detecção *in situ* por UV.

A comparação dos perfis de dissolução pode ser realizada por meio de diversos métodos, onde, dentre eles, o fator de semelhança (F2) é aquele considerado de mais fácil aplicação, razão pela qual é adotado por diversos órgãos regulatórios como FDA, EMA e ANVISA. Apesar de sua fácil aplicação, F2 está sujeito a críticas estatísticas, visto que seus critérios de aceitação são muito amplos, aumentando o critério de conclusão entre perfis semelhantes (LIU, 1997).

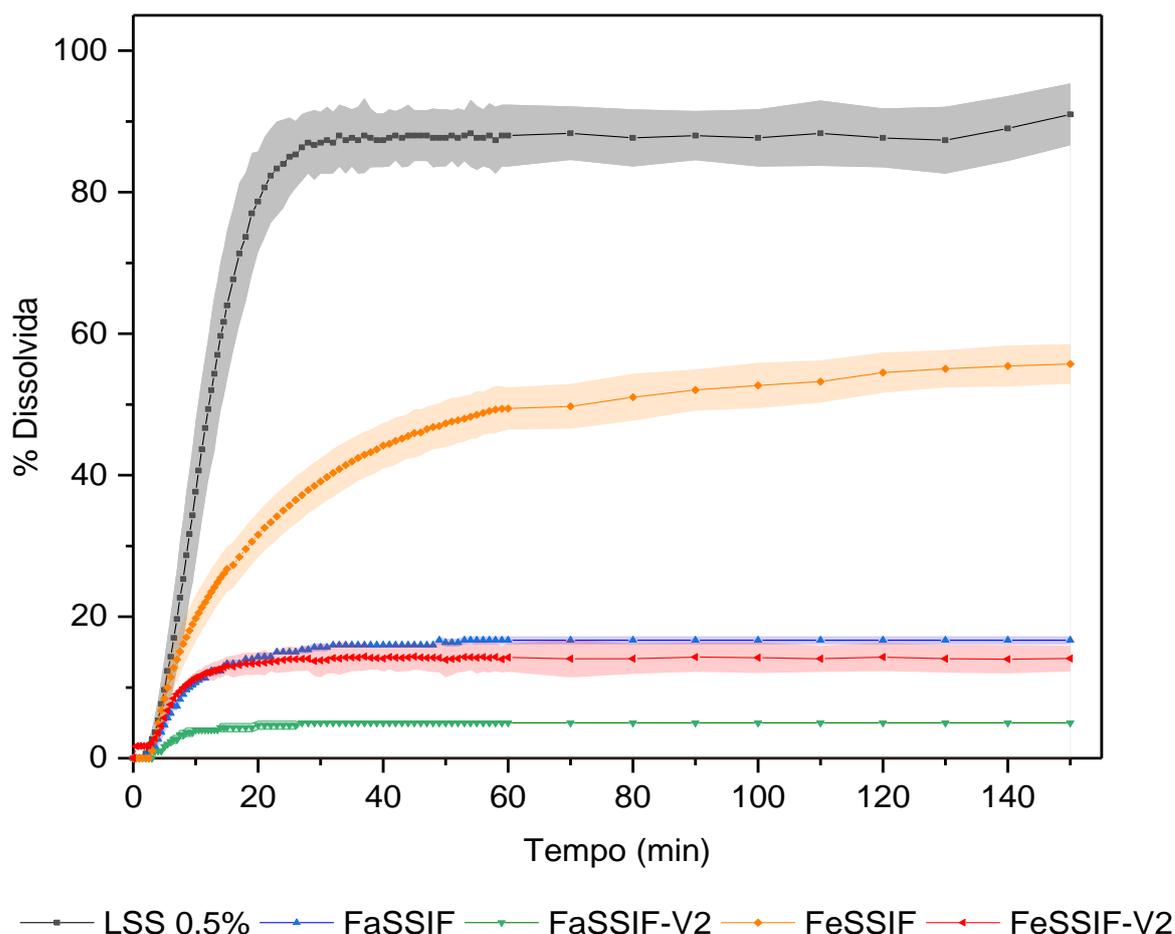


Figura 8: Perfis de dissolução de comprimidos de efavirenz 600 mg nos diferentes meios de dissolução testados quantificados por sonda de UV *in situ*. Os dados são apresentados como média de três replicatas independentes. As áreas sombreadas correspondem ao desvio padrão.

O método de modelo independente, com cálculo de F2, confronta a média dos perfis de dissolução, usando a variância como modelo comparativo. Os testes foram realizados nos intervalos limites ao platô da dissolução e, quando não houve platô ou quando a dissolução não atingiu 100%, utilizou-se o marco de 85% de fármaco dissolvido. A Tabela 10 apresenta os resultados para os cálculos de F2, a partir dos dados da dissolução em meios biorrelevantes com quantificação *in situ* por sonda UV. Aos pares, os meios de dissolução FaSSIF-V2 / FaSSIF, FeSSIF-V2 / FaSSIF, FeSSIF-V2 / FaSSIF-V2, apresentaram F2 maior que 50, logo são considerados semelhantes. Os demais foram considerados não-selhantes.

Tabela 10: Dados do fator de semelhança (F2) comparando todos os meios de dissolução biorrelevantes testados a partir da quantificação com sonda UV *in situ*.

F2	LSS 0,5%	FaSSIF	FeSSIF	FaSSIF-V2	FeSSIF-V2
LSS 0,5%	x	11,81	22,37	8,58	11,30
FaSSIF	11,81	x	31,73	51,28	85,60
FeSSIF	22,37	31,73	x	24,49	30,40
FaSSIF-V2	8,58	51,28	24,49	x	54,31
FeSSIF-V2	11,30	85,60	30,40	54,31	x

Segundo Yuksel e colaboradores (2000) os métodos de modelo independente são menos discriminativos que os métodos de modelo dependente ou aqueles baseados na análise de variância. Os modelos baseados na ANOVA utilizam os dados de dissolução na sua forma original ou com transformações simples e sua análise é capaz de mostrar diferenças estatísticas de nível (tamanho) e formato (paralelismo). No geral, acredita-se que os métodos estatísticos baseados na ANOVA fornecem melhores resultados (SATHE, 1996; YUSKEL *et al.*, 2000; ADAMS, 2001).

Tendo em vista que os resultados da análise de modelo independente mostraram resultados conflitantes com o racional do experimento como, por exemplo, indicando que o perfil de dissolução com meios biorrelevantes que simula o estado alimentado do intestino delgado (FeSSIF-V2) é semelhante ao estado de jejum (FaSSIF-V2), realizou-se uma comparação por ANOVA de dois fatores com repetição e pós teste de Tukey (Tabela 11).

Diferente do resultado mostrado pelo cálculo do método independente de modelo, os testes de ANOVA *post hoc* Tukey mostraram que apenas o par FeSSIF-V2 / FaSSIF não apresentou diferença significativa entre os perfis de dissolução. Tais resultados estatisticamente semelhantes para meios biorrelevantes com propostas tão diferentes pode ser justificado pela presença do tampão maleato na quantificação direta por UV, que, como já mencionado, pode interferir nas leituras. Tal interferência também pode justificar o fato de perfis de dissolução de meios biorrelevantes com a mesma proposta (FeSSIF e FeSSIF-V2 ou FaSSIF e FaSSIF-V2) e composição semelhante terem apresentado resultados discrepantes. Além disso, conforme evidenciado pela Figura 9, no decorrer do processo de dissolução, os meios apresentam elevada quantidade de partículas suspensas, principalmente aqueles que

representam os estados de jejum (FaSSIF e FaSSIF-V2), devido ao reduzido volume utilizado (500 mL) recomendado para simulação de tais condições fisiológicas.

Tabela 11: Resultado do teste ANOVA *post hoc* Tukey para a comparação dos perfis de dissolução utilizando sonda UV *in situ* como método de quantificação.

Comparação dos perfis de dissolução	Tempo em que passaram a apresentar diferença (min)	Valor de p*
FaSSIF vs. LSS 0,5%	6	0,0170
FaSSIF-V2 vs. LSS 0,5%	5	0,0170
FeSSIF vs. LSS 0,5%	7,5	0,0273
FeSSIF-V2 vs. LSS 0,5%	6,5	0,0083
FaSSIF-V2 vs. FaSSIF	11	0,0369
FeSSIF vs. FaSSIF	8	0,0443
FeSSIF-V2 vs. FaSSIF	**	--
FeSSIF vs. FaSSIF-V2	5,5	0,0170
FeSSIF-V2 vs. FaSSIF-V2	9	0,0493
FeSSIF-V2 vs. FeSSIF	9	0,0383

* Valor de p quando passou a apresentar diferença

** Não houve diferença significativa entre os perfis de dissolução a um nível de significância de 95%.

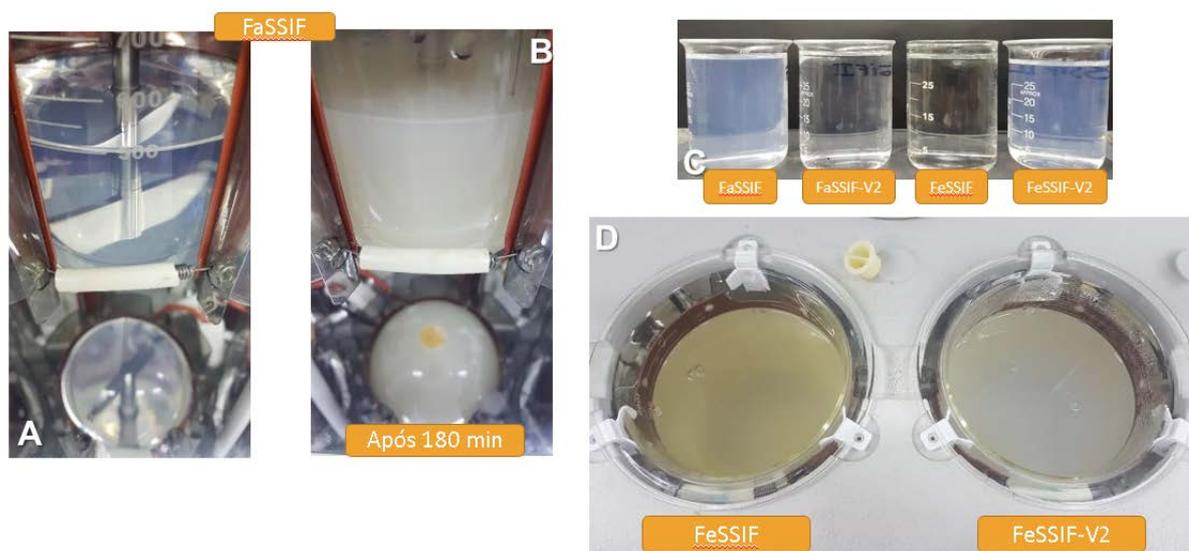


Figura 9: Meios de dissolução biorrelevantes antes e após ensaio com um comprimido de 600 mg de efavirenz, evidenciando grande quantidade de partículas suspensas ao final do ensaio. A: FaSSIF antes do início do ensaio; B: FaSSIF após 180 minutos de ensaio de dissolução; C: meios de dissolução biorrelevantes utilizados; D: meios de dissolução FeSSIF e FeSSIF-V2 após 180 minutos de dissolução.

O material particulado pode interferir na quantificação *in situ* pela difração da luz UV. Por isso, os ensaios de dissolução foram realizados novamente com a quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência a fim de entender a influência da composição dos meios biorrelevantes e do material particulado nas diferenças entre os perfis.

6.4 PERFIL DE DISSOLUÇÃO COM QUANTIFICAÇÃO POR CLAE/UV

A Figura 10 apresenta os perfis de dissolução de comprimidos de efavirenz 600 mg em meios biorrelevantes e quantificação através da coleta de alíquotas, utilizando CLAE/UV como método de quantificação.

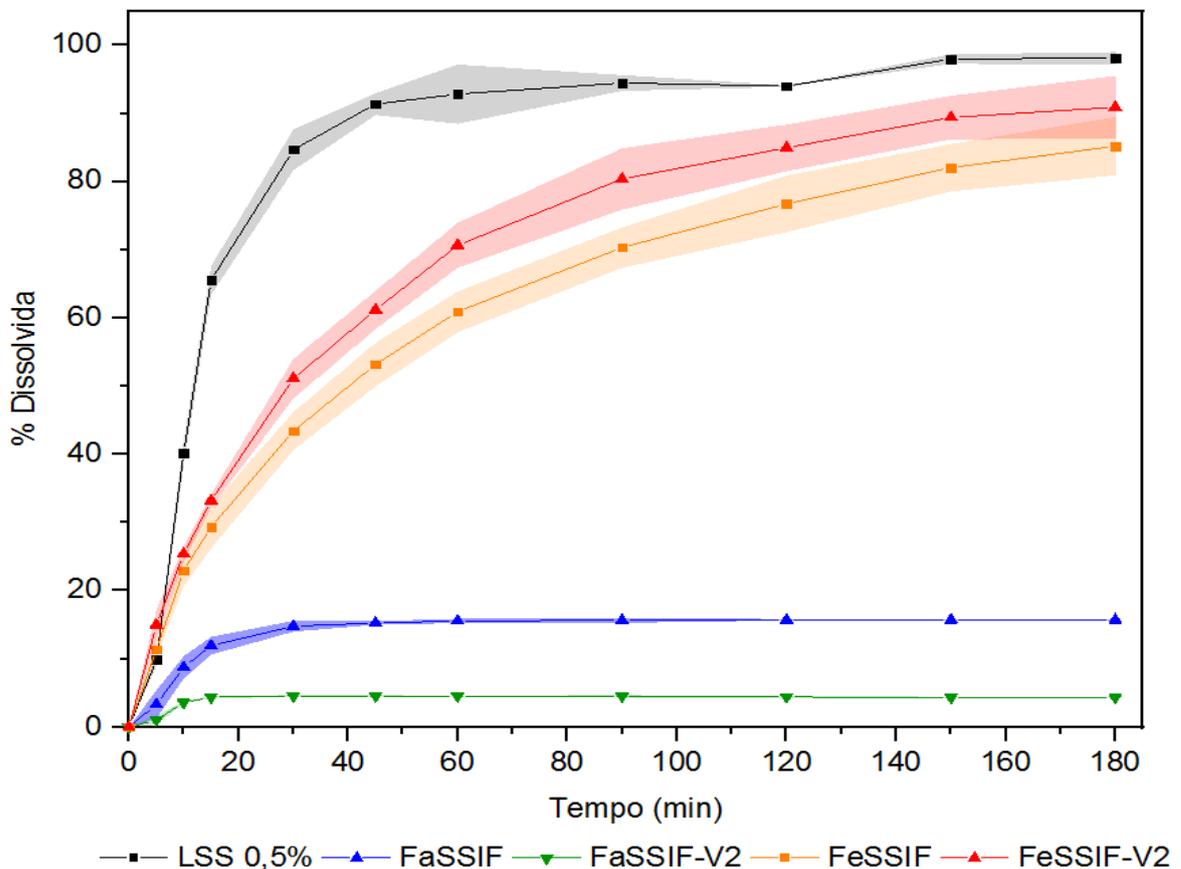


Figura 10: Perfis de dissolução de comprimidos de efavirenz 600 mg nos diferentes meios de dissolução testados quantificados CLAE/UV. Os dados são apresentados como média de triplicatas independentes. As áreas sombreadas correspondem ao desvio padrão.

O cálculo da quantidade de EFV foi determinado com base na curva de calibração presente no Anexo I. Ambos os perfis apresentaram desvio padrão relativo inferior a 20% nos primeiros pontos de coleta e inferior a 10% nos demais pontos, conforme Anexo III, conforme recomendado pela RDC n. 31/2010.

A baixa dissolução do efavirenz no meio intestinal simulado em jejum pode ser justificada pela sua solubilidade. Conforme o item 6.1, a solubilidade do EFV nestes meios foi de 0,182 mg/mL para FaSSIF e 0,036 mg/mL para FaSSIF-V2 (Tabela 7). Assim, a dose de EFV nos comprimidos utilizados no estudo de dissolução está acima da concentração de saturação, o que impossibilita a dissolução total do fármaco e resulta em valores de quantidade dissolvida reduzidos.

Neste estudo, a quantidade total de EFV dissolvida após 180 minutos no meio FaSSIF foi de 14,81% enquanto para FeSSIF foi de 84,97%, um incremento de 82,57%, que está de acordo com os resultados de Kaul e colaboradores (2010), no qual a administração desse medicamento em concomitância com refeições ricas em gordura leva a um aumento da ASC. Tal resultado também concorda com os dados de Bedor (2011), que demonstrou aumento da quantidade de EFV dissolvida em FeSSIF quando comparado a FaSSIF.

Os perfis de dissolução obtidos por CLAE/UV foram comparados pelo método de modelo independente, apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Dados do fator de semelhança (F2) comparando todos os meios de dissolução biorrelevantes testados a partir da quantificação com CLAE/UV.

F2	FaSSIF	FaSSIF-V2	FeSSIF	FeSSIF-V2	LSS 0,5%
FaSSIF	x	52,35	16,03	14,34	9,51
FaSSIF-V2	52,35	x	15,20	10,94	6,75
FeSSIF	16,03	12,39	x	66,85	34,66
FeSSIF-V2	14,34	10,94	66,85	x	39,62
LSS 0,5%	9,51	6,75	34,66	39,62	x

Diferente dos resultados obtidos pela detecção com sonda UV *in situ*, aos pares, os meios de dissolução FeSSIF / FeSSIF-V2 e FaSSIF / FaSSIF-V2 apresentaram F2 maior que 50, sendo considerados semelhantes. Tais resultados correspondem ao racional dos meios biorrelevantes testados, visto que estes refletem

o mesmo ambiente fisiológico. Entretanto, em relação aos meios que simulam o jejum, esta análise estatística não reflete o perfil encontrado; por isso foi realizada comparação por ANOVA de dois fatores com repetição e pós teste de Tukey para os dados obtidos por CLAE/UV, apresentados na Tabela 13. Ao contrário do que foi apresentado pela avaliação estatística através do cálculo de F2, apenas os meios de dissolução FeSSIF e FeSSIF-V2 foram considerados semelhantes.

Tabela 13: Resultado do teste *two-way* ANOVA *post hoc* Tukey para a comparação dos perfis de dissolução utilizando CLAE/UV como método de quantificação.

Comparação dos perfis de dissolução	Tempo em que passaram a apresentar diferença (min)	Valor de p*
FaSSIF vs. LSS 0,5%	10	<0,0001
FaSSIF-V2 vs. LSS 0,5%	10	<0,0001
FeSSIF vs. LSS 0,5%	10	<0,0001
FeSSIF-V2 vs. LSS 0,5%	10	<0,0001
FaSSIF-V2 vs. FaSSIF	30	0,0007
FeSSIF vs. FaSSIF	10	<0,0001
FeSSIF-V2 vs. FaSSIF	5	<0,0001
FeSSIF vs. FaSSIF-V2	5	0,0005
FeSSIF-V2 vs. FaSSIF-V2	5	<0,0001
FeSSIF-V2 vs. FeSSIF	**	-

* Valor de p quando passou a apresentar diferença.

** Não houve diferença significativa entre os perfis de dissolução a um nível de significância de 95%.

O meio de dissolução FaSSIF apresenta a mesma concentração de sais biliares que FaSSIF-V2, enquanto a quantidade de fosfolídeos é 3,5 vezes maior (Tabela 4). O estudo realizado por Leigh, Kloefer e Schaich (2013) avaliou a dissolução de diversos fármacos nesses mesmos meios e mostrou que para aqueles pouco solúveis os perfis de dissolução mostraram-se significativamente diferentes, no qual os ensaios em FaSSIF apresentaram maior quantidade dissolvida de fármaco do que em FaSSIF-V2. Segundo o autor, tal fato se justifica pela maior concentração de lecitina em FaSSIF, o que modifica a composição das micelas mistas formadas e afeta a solubilidade dos fármacos em questão. Este raciocínio pode ser utilizado para justificar

as diferenças nos valores de solubilidade e no perfil de dissolução do EFV encontrados para esses meios, neste estudo (Tabela 9 e Figura 10).

A mesma comparação pode ser realizada observando-se a concentração de sais biliares e fosfolípídeos em FeSSIF e FeSSIF-V2 (Tabela 4). O meio de dissolução na sua versão 2 apresenta quantidades 1,5 e 1,85 vezes menor de sais biliares e fosfolípídeos, respectivamente. Entretanto, esta redução não é suficiente para afetar a dissolução do fármaco, uma vez que os perfis nesses meios não apresentaram diferenças significativas. A comparação entre os ensaios realizados em FaSSIF / FaSSIF-V2 e FeSSIF / FeSSIF-V2 indicam como o fármaco e a formulação podem ser afetados *in vivo* pelas variações nas concentrações de sais biliares, fosfolípídeos e ácidos graxos livres.

De modo a discutir a influência do método de detecção, a Tabela 14 apresenta os dados de eficiência de dissolução (ED), para a quantificação realizada por CLAE/UV e por sonda UV *in situ*. A Figura 11 apresenta os perfis de dissolução comparando ambos os métodos de detecção utilizados, de acordo com o meio de dissolução testado.

Tabela 14: Eficiência de dissolução a partir da quantificação utilizando sonda de UV *in situ* e CLAE/UV. Os dados são apresentados como média e desvio padrão de três replicatas independentes. Os desvios são apresentados em até duas casas decimais.

Método de Detecção	UV <i>in situ</i>	CLAE/UV
Meio de Dissolução	Eficiência de Dissolução (%)	
FaSSIF	15,41 ± 0,00	14,27 ± 0,00
FaSSIF-V2	4,71 ± 0,00	4,06 ± 0,00
FeSSIF	45,51 ± 0,03	61,15 ± 0,03
FeSSIF-V2	13,47 ± 0,02	65,55 ± 0,03
LSS 0,5%	81,05 ± 0,05	86,24 ± 0,01

Os meios de dissolução FaSSIF, FaSSIF-V2 e LSS 0,5% apresentaram, ao nível de significância de 95%, eficiências de dissolução semelhantes em relação ao método de detecção utilizado, evidenciando que o método de detecção por monitoramento dinâmico se mostrou apropriado para a quantificação do efavirenz nesses meios. Comparando individualmente os métodos de quantificação, tem-se que os meios de dissolução FaSSIF e FeSSIF-V2 apresentaram ED semelhantes para a

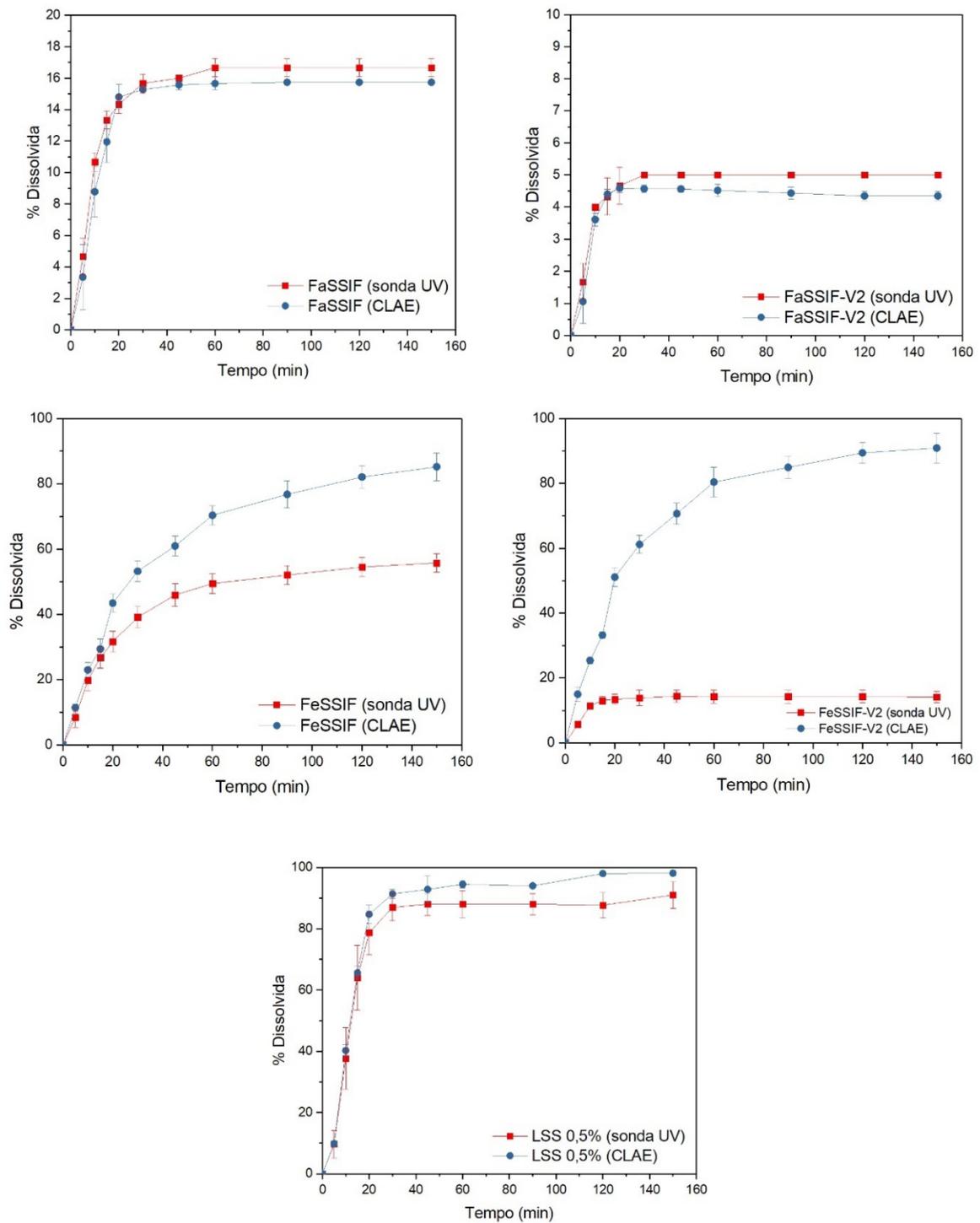


Figura 11: Comparação dos perfis de dissolução de comprimidos de efavirenz obtidos pela quantificação por sonda de UV *in situ* e por CLAE/UV, de acordo com o meio de dissolução testado. Os dados são apresentados como média de três replicatas independentes e seus respectivos desvios padrão.

quantificação pela sonda de UV *in situ* enquanto FeSSIF e FeSSIF-V2 mostraram ED semelhantes para a quantificação por CLAE/UV.

Como já mencionado, os meios de dissolução FeSSIF e FeSSIF-V2 representam o mesmo ambiente fisiológico. Sendo o segundo uma versão atualizada do primeiro, onde as concentrações de lecitina são reduzidas. Apesar disso, a quantificação da dissolução do EFV pela sonda de UV *in situ* mostrou diferenças significativas em relação à quantificação em CLAE/UV, em termos de quantidade dissolvida, em relação à eficiência de dissolução e na comparação dos perfis de dissolução para estes meios.

A comparação dos perfis de dissolução obtidos pelos diferentes métodos de detecção por *two-way* ANOVA (Tabela 15) mostrou que a quantificação utilizando a sonda de UV *in situ* foi efetiva apenas para os meios LSS 0,5%, FaSSIF e FaSSIF-V2 onde não houve diferenças significativas em relação à quantificação por CLAE/UV. Tendo em vista a utilização do tampão maleato tanto por FaSSIF-V2 quanto por FeSSIF-V2, tem-se que este sistema tamponante não interfere nas leituras pela sonda de UV *in situ*, discordando da proposta de Mauger e colaboradores (2017).

Tabela 15: Resultado da comparação estatística por *two-way* ANOVA dos métodos de quantificação avaliados em relação ao meio de dissolução testado.

Meio de Dissolução	A influência do método de detecção é significativa?	Valor de p
FaSSIF	Não	0,0898
FaSSIF-V2	Não	0,0727
FeSSIF	Sim	< 0,001
FeSSIF-V2	Sim	0,0026
LSS 0,5%	Não	0,2048

Kloefer e colaboradores (2010) estudaram as características físico-químicas dos meios biorrelevantes FaSSIF e FeSSIF. Os autores mostram que FeSSIF apresenta uma alta absorvância em comprimentos de onda abaixo 300 nm devido à oxidação dos fosfolídeos presentes no meio. Tal interferência apresenta-se menos pronunciada em FaSSIF devido às concentrações reduzidas de lecitina. Desse modo, pode-se inferir que a concentração de fosfolídeos em FeSSIF é o principal interferente na quantificação do EFV pela sonda de UV *in situ*. Apesar da

concentração reduzida de lecitina em FeSSIF-V2, a presença dos derivados lipídicos, aparentemente, também interfere na quantificação pela sonda.

A principal diferença entre a quantificação do EFV por CLAE e pela sonda de UV *in situ* consiste no desafio de realizar a quantificação diretamente no dissolutor, sem nenhum tratamento da amostra onde excipientes e demais componentes do meio de dissolução podem interferir absorvendo ou dispersando a luz. Para remoção da contribuição dos demais componentes do sistema são utilizados filtros matemáticos que incluem a correção da linha de base e o cálculo de segunda derivada (NIR & LU, 2018). No presente estudo, os filtros matemáticos aplicados foram suficientes para os meios de dissolução LSS 0,5%, FaSSIF e FaSSIF- V2, onde os perfis de dissolução são semelhantes para ambos os métodos de detecção.

O trabalho realizado por Liu e colaboradores (2008) comparou o sistema de detecção por sonda de UV *in situ* em relação à quantificação tradicional por UV. O sistema *in situ* mostrou-se linear e consistente em comparação ao método de quantificação tradicional.

A revisão publicada por Bou-Chacra e colaboradores (2017) indica que, na última década, cresceu a utilização de meios biorrelevantes para determinação da solubilidade e para o estudo da dissolução, especialmente para fármacos classe II do SCB, com um total de 25% de trabalhos publicados de 2007 a 2017. A utilização dos meios biorrelevantes é relatada como um método confiável e reproduzível para a avaliação de candidados a fármacos e para o desenvolvimento de formas farmacêuticas. Além disso, fornecem um meio de estabelecer métodos de dissolução mais preditivos da dissolução *in vivo*, principalmente para fármacos pouco solúveis (MANN *et al.*, 2017).

A dissolução em LSS 0,5% consiste no método padronizado e validado por Farmanguinhos para dissolução de comprimidos revestidos de efavirenz 600 mg. Ao serem observados os valores de ED, nenhum dos meios biorrelevantes avaliados mostrou desempenho semelhante ao LSS 0,5%. O estudo realizado por Bedor (2011) comparou o medicamento de referência com uma formulação teste utilizando aparato 4 de dissolução e evidenciou que a dissolução em LSS 0,5% não é capaz de

discriminar diferenças entre as formulações propostas enquanto a dissolução em FeSSIF, sim.

Como já mencionado, as análises realizadas com detecção por sonda de UV *in situ* indicaram semelhanças entre os resultados de FeSSIF-V2 e FaSSIF. Já as análises realizadas com detecção CLAE/UV mostraram semelhanças entre os resultados de FeSSIF-V2 e FeSSIF, evidenciando a necessidade de modificação do método de quantificação das amostras. Assim, a avaliação da correlação *in vitro-in vivo* foi realizada a partir dos resultados obtidos com a quantificação por CLAE/UV.

6.5 CORRELAÇÃO *IN VITRO-IN VIVO*

6.5.1 Simulação do comportamento gastrointestinal utilizando o GastroPlus™

Os parâmetros farmacocinéticos simulados a partir de dados físico-químicos e fisiológicos comparados com os obtidos *in vivo* e com dados da literatura estão apresentados na Tabela 16. A Figura 12 apresenta o perfil de concentração plasmática *versus* tempo obtido através do estudo de bioequivalência e os valores simulados pelo programa GastroPlus™ tanto para o estado de jejum quanto alimentado. Estes dados avaliam a capacidade do programa em simular a biodisponibilidade a partir dos parâmetros inseridos (Tabela 6).

Tabela 16: Parâmetros farmacocinéticos experimentais e simulados com base nos estudos de bioequivalência dos comprimidos de efavirenz 600 mg.

	Parâmetro Farmacocinético	Dados Simulados	Dados Experimentais/Literatura	Erro de Predição (%) ^c
Jejum	C _{máx} (µg/mL)	2,94 ± 0,40	2,93 ± 0,83 ^a	0,341
	T _{máx} (h)	3,20 ± 0,72	4,50 ± 1,83 ^a	28,9
	ASC _{0-t} (µg.h/mL)	127,85 ± 6,35	137,95 ± 42,85 ^a	7,32
	ASC _{0-∞} (µg.h/mL)	182,70 ± 9,75	184,52 ± 52,63 ^a	0,986
Alimentado	C _{máx} (µg/mL)	3,164 ± 0,26	4,611 ± 0,65 ^b	31,38
	T _{máx} (h)	2,4 ± 0,88	3,00 ± 2,00 ^b	20,00
	ASC _{0-t} (µg.h/mL)	190,81 ± 18,30	**	--
	ASC _{0-∞} (µg.h/mL)	133,51 ± 20,40	**	--

a. HONÓRIO *et al.*, 2013; b. LAMORDE *et al.*, 2012; c. calculado conforme equação 9. ** Não descrito.

É importante salientar que não há uma referência regulatória para a aplicação da CIVIV para formulações de liberação imediata. A RDC n. 482 de 19 de março de

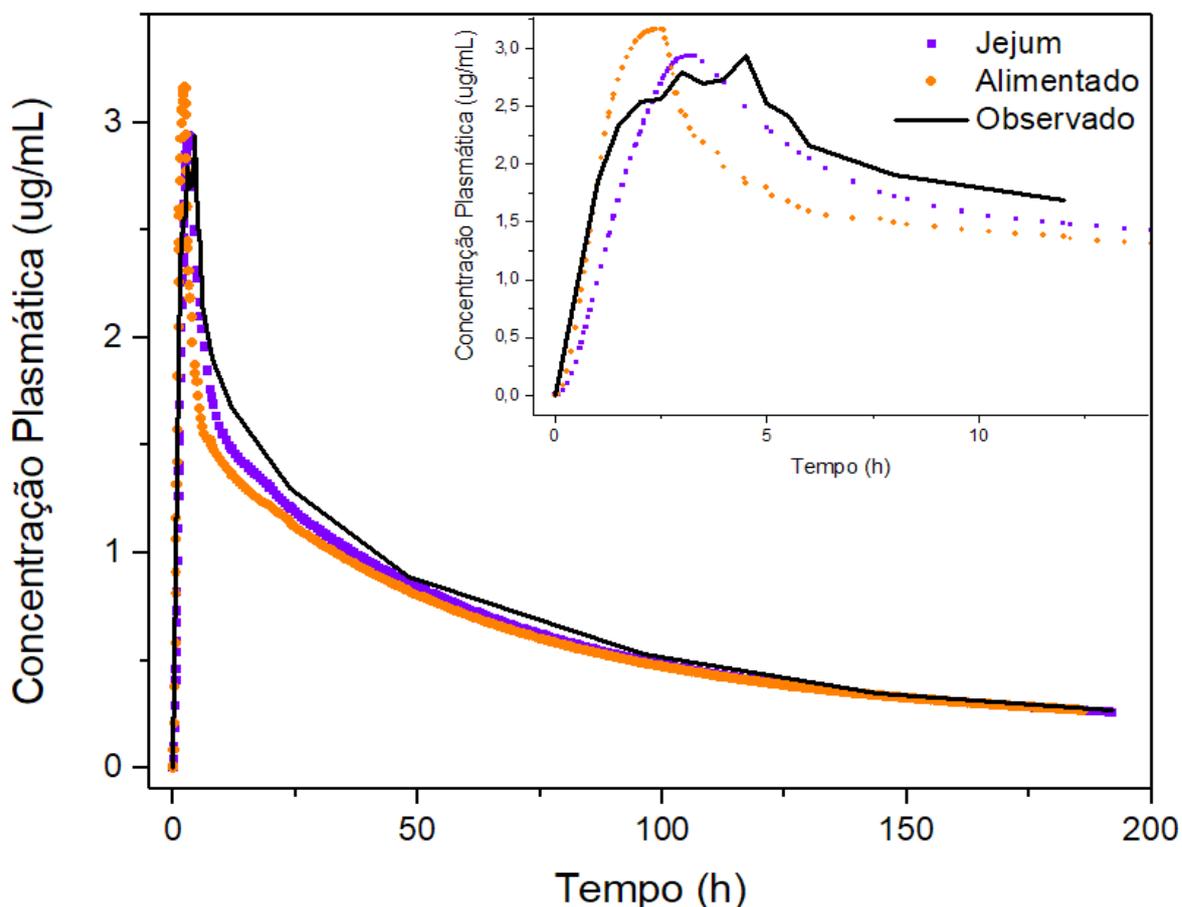


Figura 12: Perfis de concentração plasmática *versus* tempo dos dados observados *in vivo* (jejum) (HONÓRIO *et al.*, 2013) e simulados (jejum e alimentado) utilizando parâmetros físico-químicos e fisiológicos como dados de entrada para o GastroPlus™.

2002 que traz o Guia para Estudos de CIVIV cita que as correlações de nível B e C são as melhores que podem ser recomendadas para esses medicamentos, inferindo não ser possível uma correlação de nível A, devido ao reduzido número de estudos publicados (ANVISA, 2002). O FDA, no “Guia para Ensaio de Dissolução para Formas Farmacêuticas Sólidas Orais” (do inglês, *Guidance for Industry Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*), indica que a CIVIV é possível para formulações de liberação imediata que envolvem apenas fármacos classe II do SCB, e que esta pode ser utilizada para distinção entre formulações bioequivalentes das não-bioequivalentes mediante a avaliação de três lotes que

apresentem desempenho *in vivo* diferentes. Entretanto, não menciona como a CIVIV deve ser realizada nem quais os critérios de aceitação (CDER, 1997a).

Já o “Guia para Formas Farmacêuticas de Liberação Modificada: desenvolvimento, avaliação e aplicação de CIVIV” (do inglês, *Guidance for Industry Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation and Application of In vitro/In vivo Correlations*) também do FDA, diz que uma boa predição deve apresentar valores percentuais de erro de predição (%EP) iguais ou menores que 10% para C_{max} e ASC (CDER, 1997). Os dados obtidos mostram que os valores simulados para condição em jejum aproximam-se dos valores experimentais, com %EP ao valor determinado, indicando que o modelo utilizado – ASF Opt logD Model AS/V 6.1 – forneceu uma boa predição da absorção do efavirenz, com base nos dados teóricos fornecidos ao programa (HONÓRIO *et al.*, 2013).

A simulação da biodisponibilidade de comprimidos de EFV utilizando o GastroPlus™ foi realizada anteriormente por Honório e colaboradores (2013) onde os parâmetros farmacocinéticos encontrados concordam com os dados apresentados por este estudo. Os valores de C_{max} , T_{max} e ASC_{0-t} foram de 2,81 µg/mL; 3,4 h e 131,94 µg.h/mL, respectivamente, contra 2,94 µg/mL; 3,20 h e 127,85 µg.h/mL deste estudo (Tabela 16). Os valores de %EP descritos pelo estudo também se apresentaram inferiores a 10%, exceto para T_{max} .

O modelo de simulação da absorção utilizado neste estudo foi o mesmo utilizado por Grbic e colaboradores (2011), com sucesso, na simulação da absorção de comprimidos de liberação imediata de glicazida, além de ser útil na identificação das especificações necessárias para que a dissolução *in vitro* fosse preditiva do processo *in vivo*. Os autores utilizaram dados *in vivo* da literatura para simular a biodisponibilidade e propor um critério de aceitação para o desenvolvimento de uma metodologia de dissolução *in vitro* que fosse capaz de prever o comportamento da formulação em humanos visando substituir os estudos clínicos. O estudo relata valores de %EP de 7,05% para C_{max} , 6,13% para ASC_{0-t} , evidenciando a capacidade do modelo de absorção utilizado pelo programa em prever a absorção oral da glicazida. Dessa forma, o modelo ASF Opt log D Model AS/V 6.1 é relatada com sucesso na literatura para a previsão da cinética de absorção desse e de diversos

outros fármacos SCB classe II (KOVACEVIC *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011; KESISOGLOU *et al.*, 2016; MILLER *et al.*, 2019).

O valor de %EP para T_{max} apresentou-se acima de 10%. Não há especificação para este parâmetro, entretanto, uma possível razão para este valor aumentado é que a simulação dos parâmetros farmacocinéticos não envolve o detalhamento da composição da forma farmacêutica, além de considerar os dados médios ao invés dos dados individuais, o que pode justificar esse valor para %EP (HONÓRIO *et al.*, 2013).

Em relação à simulação realizada no estado alimentado os dados de biodisponibilidade mostraram resultados de %EP acima de 10% tanto para C_{max} quanto para T_{max} . Neste caso, o cálculo de %EP foi realizado comparando os dados simulados pelo GastroPlus™ com os dados farmacocinéticos do EFV apresentados no estudo clínico realizado por Lamorde e colaboradores (2012). O referido estudo foi realizado com uma população específica de pacientes, o que pode não refletir as reais condições do fármaco *in vivo*. Tal avaliação clínica foi realizada a partir da quantificação individual do EFV frente a uma terapia de dose fixa com tenofovir e emicitabina. O estudo em questão foi realizado com pacientes portadores do HIV em Uganda e buscou avaliar se tal terapia poderia ser administrada junto à alimentação, concluindo que, para o EFV, a alimentação representa um aumento de C_{max} e de ASC. Devido aos seus efeitos tóxicos ao sistema nervoso central, não é recomendada a concomitância. (LAMORDE *et al.*, 2012). Enquanto isso, o estudo clínico utilizado na comparação dos dados simulados em jejum foi realizado com voluntários saudáveis, onde a fisiologia se aproxima dos parâmetros médios utilizados pelo GastroPlus para realizar a simulação dos parâmetros farmacocinéticos.

Os dados simulados para o estudo sob alimentação mostram um incremento de C_{max} e de ASC_{0-t} quando comparada à simulação do estado de jejum, concordando com os dados de estudos clínicos com EFV feitos em pacientes alimentados relatados na literatura (SEKAR & REYNOLDS, 1998; BRYSTOL-MEYERS, 2018).

Os dados de biodisponibilidade apresentam uma acentuada queda da concentração plasmática do fármaco, que representa a fase de distribuição, seguida por declínios mais lentos, representando a sua redistribuição e eliminação. Esta fase, é resultante da presença do fármaco nos tecidos que é difundido ao sangue

substituindo o fármaco que foi eliminado. Tal configuração caracteriza um modelo multicompartimental (HONÓRIO *et al.*, 2013; TAUBERT *et al.*, 2018). De acordo com os dados simulados pelo GastroPlus™ o modelo que mais se ajusta aos dados obtidos *in vivo* é o modelo de Loo-Riegelman, de 3 compartimentos. Portanto, este modelo foi escolhido para a realização da CIVIV. Tendo em vista o alto volume de distribuição do EFV (~252 L) e seu elevado tempo de meia-vida de eliminação (52 a 75 h), evidenciando a lenta liberação do fármaco, é esperado o ajuste a um modelo tricompartmental.

O modelo tricompartmental já foi descrito para simulação da absorção do EFV, e foi utilizado com sucesso na previsão da biodisponibilidade de nifedipina frente a sua administração junto a alimento e bebidas alcoólicas (HONÓRIO *et al.*, 2013; MERCURI *et al.*, 2016). Entretanto, o modelo monocompartimental de Wagner Nelson também já foi descrito como apto a descrever o comportamento *in vivo* do EFV em outro trabalho (HONÓRIO *et al.*, 2013).

A fração absorvida dos fármacos é, geralmente, estimada após a administração do medicamento por via oral e/ou intravascular por meio de métodos já citados. Entretanto, na ausência dos dados de administração intravenosa ou se o fármaco apresenta cinética não-linear, a análise farmacocinética convencional pode ser limitada. Assim, o desenvolvimento de uma previsão da biodisponibilidade *in silico*, que seja capaz de prever a absorção *in vivo*, é descrita como alternativa para a avaliação da CIVIV (NORRIS, *et al.*, 2000; OKUMU *et al.*, 2009; GRBIC *et al.*, 2011).

A Figura 13 apresenta as frações absorvidas do fármaco distribuídas de acordo com cada compartimento intestinal para o modelo utilizado. O modelo simulado pelo GastroPlus™ evidencia que o fármaco é absorvido, em sua maioria, no jejuno para a simulação em jejum e no duodeno para a simulação do estado alimentado. Isto pode estar relacionado ao fato de o EFV apresentar dissolução mais rápida sob alimentação (Figura 10), conforme evidenciado pelos estudos de dissolução, levando a uma absorção de grande parte do fármaco nas partes iniciais do intestino delgado. No jejum, o processo de dissolução é mais lento e, por isso, a absorção do fármaco se dá ao longo de toda a extensão intestinal.

Os dados das porcentagens absorvidas de EFV em cada um dos compartimentos intestinais, em jejum, concorda com os valores observados por Honório e colaboradores (2013) onde a absorção do fármaco se deu, em maioria no jejuno e não houve total absorção do fármaco nesta condição sendo 95,1% do EFV absorvido neste estudo contra 98,5% descrito pelo autor. O trabalho mostrou 27,4% de EFV absorvido no jejuno 1 contra 30,0% deste estudo, além de 21,8% de fármaco absorvido no jejuno 2 contra 22,6% deste estudo. Sob alimentação, os dados simulados mostram uma absorção total do fármaco ao longo do intestino, onde as partes distais, tem pouco impacto na fração absorvida do fármaco.

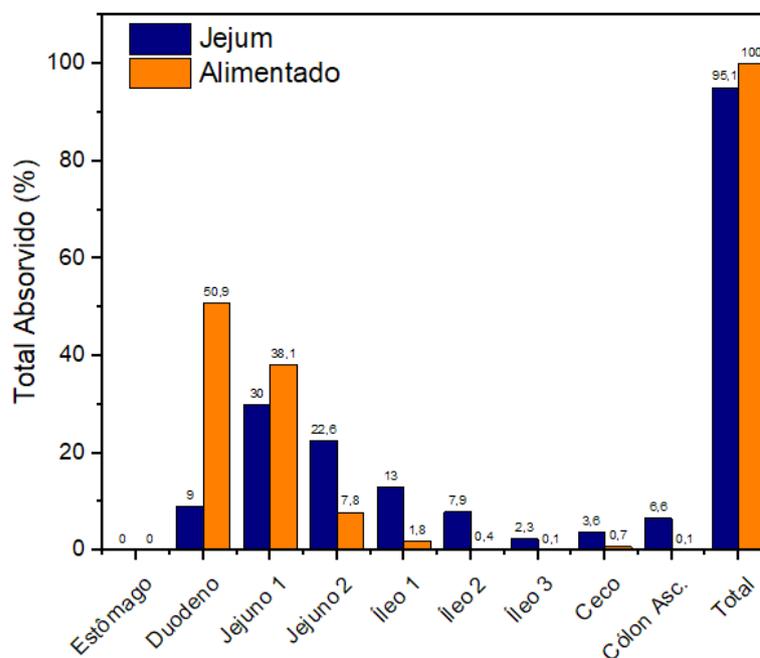


Figura 13: Simulação da absorção do efavirenz ao longo dos compartimentos intestinais.

6.5.2 Correlação *in vitro-in vivo*

A Figura 14 apresenta a CIVIV obtida por deconvolução dos dados do estudo de dissolução de acordo com o meio de dissolução testado. De acordo com os dados obtidos é possível atribuir que os meios de dissolução LSS 0,5%, FeSSIF e FeSSIF-V2 apresentaram uma boa correlação com os dados *in vivo* com coeficiente de correlação (r^2) acima de 0,95 (ANVISA, 2002). Conforme já mencionado, a obtenção de uma CIVIV utilizando uma metodologia de dissolução com LSS 0,5% para

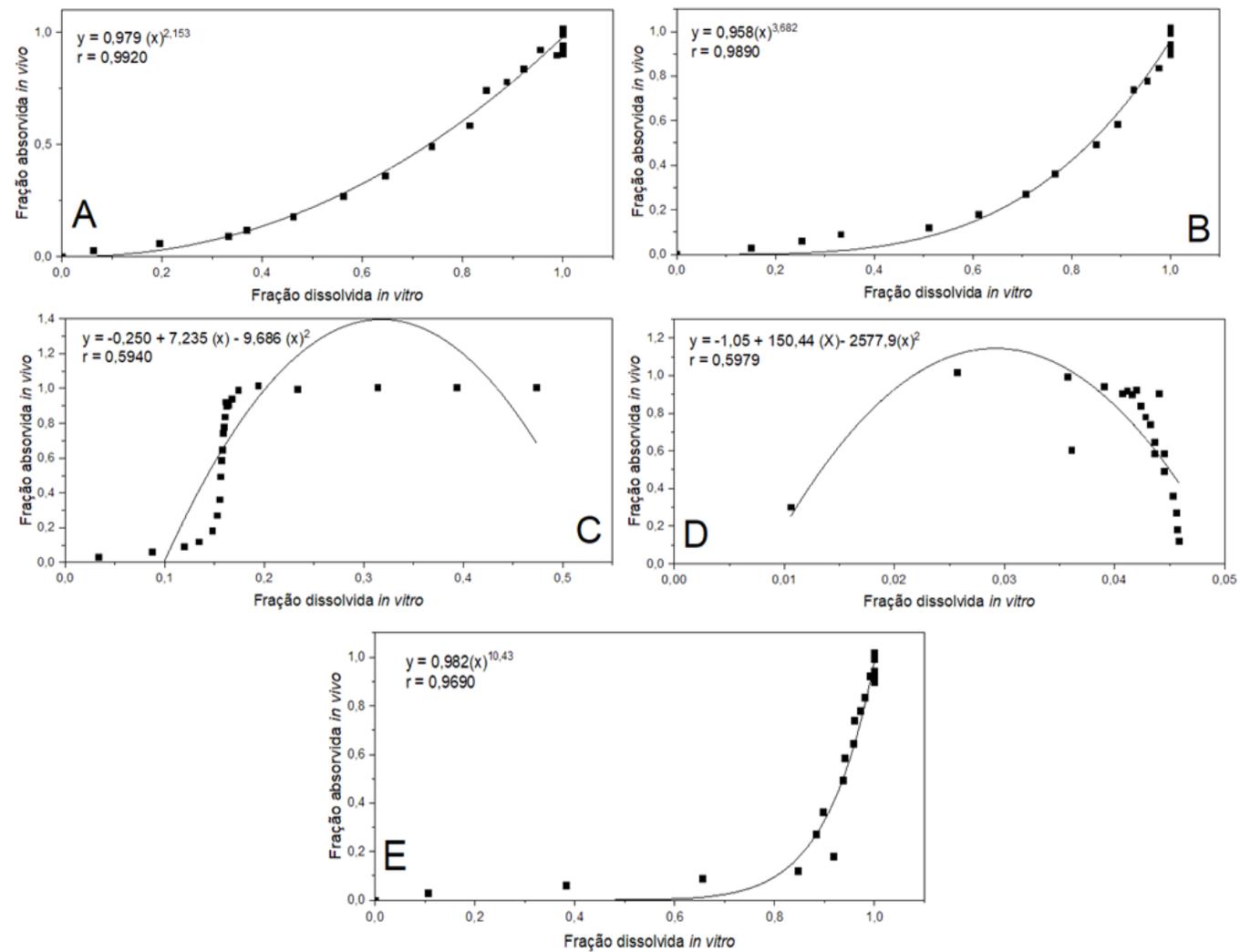


Figura 14: Correlação *in vitro-in vivo* para a dissolução de comprimidos de efavirenz em diferentes meios de dissolução de acordo com modelo tricompartmental (Loo-Riegelman). A - FeSSIF; B - FeSSIF-V2; C - FaSSIF; D - FaSSIF-V2; E - LSS 0,5%.

comprimidos de EFV foi descrita por Honório e colaboradores (2013) utilizando o modelo de Wagner-Nelson, com r^2 de 0,85 e utilizando o modelo de Loo-Riegelman, com r^2 de 0,93. Assim como para este estudo, o modelo de Loo-Riegelman mostrou-se mais descritivo em relação à correlação com os dados *in vivo*.

As frações dissolvidas do fármaco ajustam-se aos dados de fração absorvida, por meio de um modelo de regressão não-linear. A correlação obtida pela deconvolução dos dados apresentou-se, como descrito na literatura, como “formato de L invertido” (do inglês, *reverse L-shape*), para os meios LSS 0,5%, FeSSIF e FeSSIF-V2. Este tipo de correlação já foi descrito para o EFV (HONÓRIO *et al.*, 2013). A relação matemática potencial obtida entre a fração absorvida e a fração dissolvida nesses meios pode ser justificada pela alta permeabilidade do EFV. À medida que o fármaco é solubilizado, ele permeia rapidamente as membranas celulares, resultando no aumento da fração absorvida.

Polli (2000) descreve que uma CIVIV de nível A requer uma relação linear entre a fração absorvida e a fração dissolvida do fármaco, ou seja, um ajuste matemático onde r^2 é igual a 1 e o intercepto é igual a 0. Por isso, recomenda que para as formulações de liberação imediata onde, geralmente, esse tipo de correlação não é obtido, seja estabelecida uma relação *in vitro-in vivo* (RIVIV) onde o uso de um termo mais generalizado e que permita relações não lineares pode auxiliar na descrição da relação matemática para essas formulações.

Para produtos de liberação imediata, a abordagem tradicional de dois estágios utilizando a deconvolução dos dados pode ser falha, uma vez que a relação entre a fração dissolvida *in vitro* e a fração absorvida *in vivo* em muitos casos não é linear. O estudo realizado por Dunne e colaboradores (2005) revisou a utilização da abordagem de deconvolução para o estabelecimento de uma CIVIV para formulações de liberação imediata. Os autores alertam para diversas limitações, além de questões estatísticas relevantes para essa abordagem. Uma delas é que a utilização de um modelo linear para a CIVIV dessas formulações pode levar a previsões tendenciosas dos dados reais. Dessa forma, sugerem a utilização dos modelos de convolução para sanar tais problemas.

A CIVIV de nível A, como já mencionado, trata da relação linear, ou não, entre a fração absorvida e a fração dissolvida do fármaco. No entanto, esse nível de correlação também pode ser obtido através das técnicas de convolução (ALMUKAINZI *et al.*, 2014).

Neste estudo, a convolução foi utilizada como uma validação externa da CIVIV obtida por deconvolução (Figura 14). A Figura 15 apresenta a CIVIV obtida através da convolução dos dados, mostrando um perfil linear entre a concentração plasmática obtida experimentalmente e a concentração plasmática simulada a partir dos dados do estudo de dissolução. Os parâmetros farmacocinéticos simulados e observados, segundo o modelo de Loo-Riegelman de 3 compartimentos, baseados no estudo de dissolução de comprimidos de liberação imediata de efavirenz 600 mg são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Parâmetros farmacocinéticos observados *in vivo* e simulados segundo o modelo de Loo-Riegelman, baseado no estudo da dissolução do efavirenz em diferentes meios de dissolução.

Parâmetro Farmacocinético			Dados Simulados				
			LSS 0,5%	FaSSIF	FaSSIF-V2	FeSSIF	FeSSIF-V2
C _{máx} (µg/mL)	Observado <i>in vivo</i> *	2,93 ± 0,83					
	Simulado		3,108	3,294	0,333	2,872	3,067
	EP (%)		5,71	12,04	88,67	2,31	4,32
ASC _{0-t} (µg.h/mL)	Observado <i>in vivo</i> *	137,95 ± 42,85					
	Simulado		133,0	132,1	36,23	132,6	129,8
	EP (%)		2,49	3,15	73,44	2,78	4,84

* HONÓRIO *et al.*, 2013

Avaliando os parâmetros farmacocinéticos simulados de acordo com cada meio de dissolução estudado, os meios biorrelevantes FaSSIF e FaSSIF-V2 não foram capazes de mimetizar as condições *in vivo*, tendo em vista o elevado valor de %EP. Enquanto isso, os meios de dissolução LSS 0,5%, FeSSIF e FeSSIF-V2 apresentaram valores de %EP inferiores, mostrando capacidade de refletir os parâmetros farmacocinéticos *in vivo*. A avaliação da convolução dos dados através do cálculo de %EP segue a recomendação da FDA para validação externa da CIVIV (CDER, 1997).

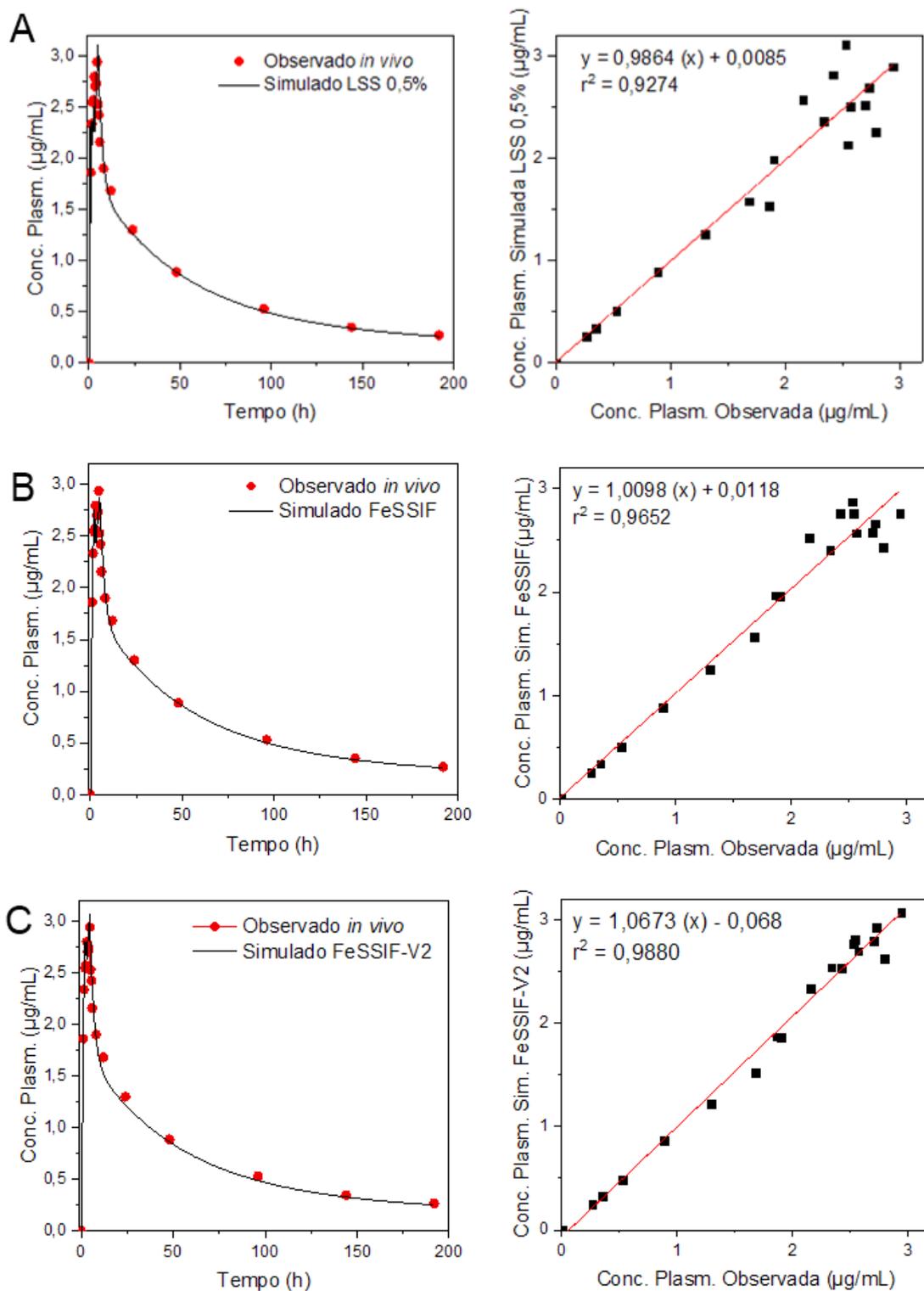


Figura 15: Correlação *in vitro-in vivo* obtida através da convolução dos dados do estudo de dissolução em concentração plasmática simulada, utilizando o modelo tricompartmental (Loo-Riegelman). A - LSS 0,5%; B - FeSSIF; C - FeSSIF-V2.

A CIVIV de comprimidos de EFV já foi descrita na literatura pela utilização metodologias utilizando LSS em diferentes concentrações. O estudo em questão mostrou que, de acordo com o modelo de Loo-Riegelman, a metodologia utilizando LSS 0,5% foi a que apresentou melhor correlação com os dados *in vivo*. Entretanto, na simulação dos parâmetros farmacocinéticos, o estudo *in vitro* não foi capaz de descrever o que ocorre *in vivo*. Os dados do trabalho mostraram %EP de -42,0% e 11,8% para C_{max} e ASC_{0-t} , respectivamente, para a dissolução em LSS 0,5%, e, ainda, valores de %EP mais elevados para a dissolução em concentrações maiores de LSS (HONÓRIO, 2012).

Os meios de dissolução FeSSIF e FeSSIF-V2 podem ser considerados os mais preditivos com relação ao processo de dissolução do fármaco *in vivo*, visto que um apresentou menor erro percentual em relação aos parâmetros farmacocinéticos e o outro maior coeficiente de correlação com os dados de biodisponibilidade, respectivamente. Como há semelhança estatística entre os perfis de dissolução, ambas as metodologias podem ser consideradas válidas para retratar o comportamento do fármaco *in vivo*.

O meio de dissolução LSS 0,5%, apesar de não apresentar melhor correlação entre os dados *in vivo* e *in vitro*, quando comparado aos meios FeSSIF e FeSSIF-V2 apresenta valor de r^2 acima de 0,9, o que pode ser considerado uma correlação aceitável (CDER, 1997). Tendo em vista o custo dos meios biorrelevantes, o LSS 0,5% tem seu uso recomendado principalmente na rotina do controle de qualidade. Além disso, o LSS 0,5% apresentou semelhança entre os perfis de dissolução utilizando as diferentes técnicas de quantificação (sonda de UV *in situ* e CLAE/UV), evidenciando a possibilidade de automação dos ensaios do controle de qualidade.

Os dados clínicos apresentados neste estudo foram realizados com voluntários em jejum. Entretanto, a CIVIV foi obtida a partir do perfil de dissolução do estado alimentado do intestino. Analisando os dados *in vitro* tem-se que a velocidade de dissolução em FeSSIF ou FeSSIF-V2 é maior do que em FaSSIF (Figura 8). Além disso, devido às concentrações de tensoativo mais elevadas nos meios que simulam o estado alimentado do intestino, a saturação do fármaco é atenuada, promovendo uma liberação gradual deste e aproximando-se do cenário *in vivo*, onde a alta

permeabilidade do EFV faz com que ele seja rapidamente absorvido e uma nova quantidade de fármaco pode ser solubilizada no TGI.

De modo a entender a influência da concentração de tensoativos na dissolução do EFV e como a velocidade de dissolução é influenciada pela solubilização micelar do fármaco é preciso atentar-se ao coeficiente de difusão do fármaco nesses meios. Conforme apontado por Takano e colaboradores (2006) a capacidade de difusão de um complexo micelar é menor do que de um fármaco livre. Ou seja, o coeficiente de difusão é reduzido em meios que apresentam maiores concentrações de tensoativo, o que pode justificar a correlação de um estudo realizado em jejum com dados *in vitro* obtidos simulando o estado alimentado.

Para os fármacos SCB classe II, se a razão entre a dose e a concentração de saturação é baixa, a dissolução *in vivo* do fármaco tende a ocorrer sob condições *sink*. Se esta razão é alta, como no caso do EFV onde a dose é de 600 mg, a absorção oral será limitada não só pela velocidade de dissolução, mas também pela solubilidade nos fluidos intestinais e, portanto, a dissolução *in vivo* ocorrerá em condições não *sink* (YU, 1999). Estudos realizados com o EFV indicam que a absorção total da dose é equivalente ao tempo da dissolução, ou seja, a dissolução é etapa limitante da absorção. Entretanto, a razão entre a dose a solubilidade *in vitro* é de mais de 40% (TAKANO *et al.*, 2006). Por isso, pode-se inferir que tanto a velocidade de dissolução quanto a solubilidade limitam a absorção do EFV.

Como já citado, assim como para o presente estudo, as diferenças no perfil de dissolução entre FaSSIF e FeSSIF já foram relatadas na literatura. O incremento da dissolução em FeSSIF quando comparado a FaSSIF foi descrito por Shono e colaboradores (2009). Os autores mostram que os resultados do efeito da alimentação *in vivo* não são consistentes com a dissolução do fármaco *in vitro* utilizando meios biorrelevantes, visto que o incremento da biodisponibilidade *in vivo* é reduzido quando comparado com o incremento *in vitro*.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a capacidade dos meios de dissolução biorrelevantes em prever o comportamento cinético do EFV *in vivo* através do estabelecimento de uma correlação entre esses dados. Os meios biorrelevantes já são bastante difundidos no desenvolvimento de medicamentos, entretanto, suas propriedades analíticas, preço e composição dificultam seu uso na rotina do controle de qualidade. Contudo, sua utilização faz com que os ensaios de dissolução sejam mais preditivos na simulação ao que ocorre *in vivo*.

Por meio dos estudos de solubilidade de efavirenz, fármaco escolhido para este estudo, observou-se que a condição *sink* não é alcançada em nenhum dos ensaios de dissolução para os meios biorrelevantes testados. Nos meios que simulam o intestino em jejum, a concentração de EFV no estudo de dissolução mantém-se acima da concentração de saturação, justificando os níveis reduzidos de fármaco dissolvido nos mesmos. Já a solubilidade nos meios de dissolução que simulam o intestino alimentado mostrou-se estatisticamente semelhante ao meio de dissolução já validado e utilizado no controle de qualidade do medicamento (LSS 0,5%) com solubilidade mais elevada apresentada por FeSSIF.

A comparação da solubilidade entre os meios de dissolução em jejum e alimentados evidencia a capacidade de solubilização micelar apresentada pelos tensoativos que compõem esses meios, onde concentrações mais elevadas de taurocolato de sódio e lecitina foram elementos-chave no aumento da solubilidade do EFV. Apesar da complexidade dos meios biorrelevantes, o EFV mostrou-se estável durante os ensaios de dissolução realizados, fato demonstrado pela alta taxa de recuperação do fármaco nos ensaios que avaliaram sua integridade química.

Os estudos de dissolução com meios biorrelevantes refletiram os resultados apresentados pelos ensaios de solubilidade onde os meios de dissolução FeSSIF e FeSSIF-V2 apresentaram total de fármaco dissolvido mais elevado (84,97% e 88,04%, respectivamente) do que os meios FaSSIF e FaSSIF-V2 (14,81% e 4,15%, respectivamente). Entretanto, ao comparar a eficiência de dissolução dos métodos testados, nenhum dos meios biorrelevantes apresentou resultados semelhantes ao

LSS 0,5%. A quantificação da dissolução através da utilização de sonda UV *in situ* apresentou interferências nos ensaios utilizando FeSSIF e FeSSIF-V2 devido à elevada concentração de lecitina nesses meios, entretanto pode ser considerada uma quantificação válida para os meios de dissolução LSS 0,5%, FaSSIF e FaSSIF-V2.

O GastroPlus™ mostrou-se uma boa ferramenta para a simulação da biodisponibilidade do efavirenz, em função dos parâmetros físico-químicos e fisiológicos do fármaco. A simulação dos dados farmacocinéticos considerou o modelo tricompartmental de Loo-Riegelman como o mais apropriado para descrever a dissolução do fármaco *in vivo*. Além disso, o modelo ASF Opt log D Model AS/V apresentou-se capaz de prever o comportamento cinético do EFV, com erros de predição menores que 10% para C_{max} e ASC_{0-t} .

Uma CIVIV de nível A foi estabelecida para os comprimidos de efavirenz. Uma correlação não linear foi obtida através do método clássico de deconvolução, entretanto, a convolução dos dados mostrou uma correlação linear entre a concentração plasmática observada e a simulada a partir dos estudos de dissolução. A melhor correlação foi obtida pelo meio de dissolução FeSSIF-V2 que apresentou valor de r^2 de 0,9880; sendo, portanto, considerado um método preditivo da biodisponibilidade oral do EFV.

A metodologia validada por Farmanguinhos, utilizando LSS 0,5%, também apresentou correlação aceitável ($r^2 = 0,9274$) e, apesar de não cumprir a exigência recomendada pela RDC n. 482/2002, por ser um método de menor custo e um tanto discriminativo, pode ser considerada adequada para o estudo da dissolução do medicamento, principalmente no que tange à rotina do controle de qualidade.

A correlação dos dados *in vivo* com a dissolução realizada em meio simulando o intestino alimentado sugere que a dissolução do fármaco no organismo ocorre em condições não-*sink* e que a alta concentração de tensoativos no meio utilizado promove uma liberação gradual do fármaco, devido à redução de seu coeficiente de difusão.

8 PERSPECTIVAS

O estudo da dissolução em meios biorrelevantes permite avaliar o comportamento cinético do fármaco em condições que mimetizam a fisiologia. Diante disso, outras formulações contendo efavirenz ou outros fármacos classe II poderiam ser estudadas nesses meios de dissolução. Além disso, a avaliação da dissolução do EFV em condições que simulam o estômago alimentado também deve ser levada em consideração, visando entender a influência da alimentação na absorção intestinal do fármaco.

Ainda no que se refere ao estudo da dissolução de fármacos pouco solúveis, uma avaliação dinâmica da dissolução poderia ser realizada, simulando a transferência do conteúdo do estômago para o intestino. Buscando entender as condições de saturação dos meios de dissolução, pode ser realizada a dissolução em duas fases, utilizando uma fase orgânica afim de simular a absorção do fármaco após sua dissolução em meio aquoso.

Em relação à CIVIV novas estratégias de formulação podem ser desenvolvidas principalmente para fármacos de classe II utilizando o GastroPlus™ como ferramenta na predição da biodisponibilidade em função dos fatores físico-químicos, fisiológicos e de formulação. E ainda, outros programas podem ser utilizados para comparar as correlações obtidas, a fim de compreender como os modelos multicompartimentais *in silico* simulam a absorção dos fármacos pouco solúveis.

As simulações *in silico* podem ser utilizadas, ainda, no desenvolvimento de métodos de dissolução preditivos, visando mimetizar as condições que melhor refletem o ambiente fisiológico humano de modo a sugerir a isenção de estudos de bioequivalência.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT NUTRITION. Ensure Plus Detailed Ingredients. **Abbott**, 2019. Disponível em: <<https://ensure.abbott/br/#know-ensure?category=know-ensure>> Acesso em: 30 set 2019.
- ADAMS, E.; COOMANS, D.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D. L. Application of linear mixed effects models to the evaluation of dissolution profiles. **International Journal of Pharmacy**, v. 226, p. 107-125, 2001.
- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. Delineamento de formas farmacêuticas: considerações biofarmacêuticas e farmacocinéticas. In: ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, p. 159-203.
- ALMUKAINZI, M.; BOU-CHACRA, N. A.; WALKER, R. B.; LÖBENBERG, R. Biorelevant Dissolution Testing. In: CHAN, C. C.; CHOW, K.; MCKAY, B.; FUNG, M. **Therapeutic Delivery Solutions**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 335–365.
- AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.
- AMIDON, K. S.; LANGGUTH, P.; LENNRNAS, H.; YU, L.; AMIDON, G. L. Bioequivalence of oral products and the biopharmaceutics classification system: science, regulation, and public policy. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 90, n. 3, p. 467–470, 2011.
- ANUMOLU, P. D.; GURRALA, S.; SATYA, S. C.V.; POLISETTY, S. V. RAVINDRAN, A.; ACHANTA, R. Development of a discriminative and biorelevant dissolution test method for atorvastatin/fenofibrate combination with appliance of derivative spectrophotometry. **Turkey Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 1, p. 62-68, 2019.
- ANDREAS, C. J.; TOMASZEWSKA, I.; MUENSTER, U.; VAN DER MEY, D.; MUECK, W.; DRESSMAN, J. B. Can dosage form-dependent food effects be predicted using biorelevant dissolution tests? Case example extended release nifedipine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 105, p. 193–202, 2016.
- ARMAND, M.; BOREL, P.; PASQUIER, B.; DUBOIS, C.; SENFT, M.; ANDRE, M.; PEYROT, J.; SALDUCCI, J.; LAIRON, D. Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. **American Journal of Physiology**, n. 271, v. 1, p. G172–G183, 1996.

ASARE-ADDO, K; CONWAY, B. R. Solubility determinations for pharmaceutical API. In: WEBSTER, G. K. JACKSON, J. D.; BELL, R. G.; KOTT, L. **Poorly Soluble Drugs: Solution and Drug Release**. 1ª ed. Singapura: Pan Stanford Publishing, 2017, p. 19-83.

ASHFORD, M. Biodisponibilidade: fatores físico-químicos e da forma farmacêutica. In: AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. (Eds.) **Aulton: Delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Inc., 2016a, p. 642-676.

ASHFORD, M. Trato gastrointestinal: fisiologia e absorção dos fármacos. In: AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. (Eds.). **Aulton: Delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016b, p. 606-649.

AUGUSTIJNS, P.; WUYTS, B.; HENS, B.; ANNAERT, P.; BUTLER, J.; BROUWERS, J. A review of drug solubility in human intestinal fluids: Implications for the prediction of oral absorption. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 1, p. 322–332, 2014.

AULTON, M. E. Dissolução e solubilidade. In: AULTON, M. E. (Ed.). **Aulton: Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Inc., 2016. p. 19–35.

BAKA, E.; COMER, J. E.; TAKÁCS-NOVÁK, K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. **Jornal of. Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n.2, p. 335–341, 2008

BEDOR, D. C. G. Avaliação biofarmacotécnica do efavirenz: um fármaco classe II (SCB). **Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco**, 2011. Disponível em: <<http://repositorio.ufpe.br>> Acesso em 20 nov. 2018.

BENET, L.Z.; AMIDON, G.L.; BARENDS, D.M.; LENNERNÄS, H.; POLLI, J.E.; SHAH, V.P.; STAVCHANSKY, S.A.; YU, L.X. The use of BDDCS in classifying the permeability of marketed drugs. **Pharmaceutical Research**, v.52, n.3, p.483-488, 2008.

BERGSTROM, C. A.; HOLM, R.; JORGENSEN, S.A.; ANDERSSON, S.B.; ARTURSSON, P.; BEATO, S.; BORDE, A.; BOX, K.; BREWSTER, M.; DRESSMAN, J.; FENG, K. I.; HALBERT, G.; KOSTEWICZ, E.; MCALLISTER, M.; MUENSTER, U.; THINNES, J.; TAYLOR, R.; MULLERTZ, A. Early pharmaceutical profiling to predict oral drug absorption: Current status and unmet needs. **European Journal Pharmaceutical Sciences**, n. 57, p. 173–199, 2014.

BONAMICI, D. Sistema de Classificação Biofarmacêutica e Bioisenções. 2009. 171p. **Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>. Acesso em 25 jul. 2018.

BOU-CHACRA, N.; MELO, K. J. C.; MORALES, I. A. C.; STIPPLER, E. S.; KESISOGLOU, F.; YAZDANIAN, M.; LÖBENBERG, R. Evolution of Choice of Solubility and Dissolution Media After Two Decades of Biopharmaceutical Classification System. **The American Association of Pharmaceutical Scientist Journal**, v. 19, n. 4, p. 989–1001, 2017.

BRADY, J. E.; RUSSELL J. W.; HOLUM, J. R. **Química: A matéria e suas transformações**. 3. ed. Rio de Janeiro: LTC, v. 1, 2002

BRASIL produz genérico de remédio para Aids. **Folha de São Paulo**. São Paulo, 18 de setembro de 2008. Disponível em: <<https://www1.folha.uol.com.br/fsp/cotidian/ff18>>

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC n. 37 de 03 de agosto de 2011. Dispõe sobre o Guia para Isenção e Substituição de Estudos de Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 04 ago. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia n. 14 de 08 de fevereiro de 2018. Guia de dissolução aplicável a medicamentos genéricos, novos e similares. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 fev. 2018. Disponível em <<http://portal.ANVISA.gov.br>> Acesso em: 15 set. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de boas práticas em biodisponibilidade: bioequivalência - Volume I. **Gerência-Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos**. Brasília, DF, 2002. Disponível em: < <http://portal.ANVISA.gov.br>> Acesso 24 abr. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução-RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 12 ago. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico - HIV AIDS 2018. **Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais**, Brasília, DF, v.49, n.53, 2018, 141p. Disponível em: < <http://aids.gov.br>> Acesso em 24 abr. 2019.

BRYSTOL-MEYERS SQUIBB CANADA. **Product Monograph: Sustiva**. Montreal, Canada. 2018. Disponível em: https://www.bms.com/assets/bms/ca/documents/productmonograph/SUSTIVA_EN_pm.pdf

BROCCATELLI, F.; CRUCIANI, G.; BENET, L. Z.; OPREA, T. I. BDDCS Class Prediction for new molecular entities. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 3, p. 570–580, 2012.

BURGER, D.; VAN DER HEIDEN, I.; LA PORTE, C.; VAN DER ENDE, M.; GROENEVELD, P.; RICHTER, C.; KOOPMANS, P.; KROON, F.; SPRENGER, H.; LINDEMANS, J.; SCHENK, P.; VAN SCHAIK, R. Interpatient variability in the pharmacokinetics of the HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz: The effect of gender, race, and CYP2B6 polymorphism. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 148–154, 2006.

BUXTON, I. L. Farmacocinética e farmacodinâmica. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Eds). **Goodman & Gilman: As bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 1–36.

CHEN, L.; LI, X.; PANG, Y.; LI, L.; ZHANG, X. YU, L. Resistant starch as a carrier for oral colon-targeting drug matrix system. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v. 18, p. 2199-2203, 2007.

CHIANG, P.C.; LIU, J.; FAN, P.; WONG H. Exploring a Kinetic Model Approach in Biopharmaceutics: Estimating the Fraction Absorbed of Orally Administered Drugs in Humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 7, p. 1798-1805, 2018.

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

CHRISTENSEN, J. Ø.; SCHULTZ, K.; MOLLGAARD, B.; KRISTENSEN, H. G.; MULLERTZ, A. Solubilisation of poorly water-soluble drugs during *in vitro* lipolysis of medium- and long-chain triacylglycerols. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 3, p. 287–296, 2004.

CLARYSSE, S.; TACK, J.; LAMMERT, F.; DUCHATEAU, G.; REPPAS, C.; AUGUSTIJNS, P. Postprandial evolution in composition and characteristics of human duodenal fluids in different nutritional states. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 98, v. 3, p. 1177–1192, 2009.

COOK, J. A.; DAVIT, B. M.; POLLI, J. E. Impact of biopharmaceutics classification system-based biowaivers. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 5, p. 1539–1544, 2010.

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

DA COSTA, M. A.; SEICEIRA, R. C.; RODRIGUES, C. R.; HOFFMEISTER, C. R. D.; CABRAL, L. M.; ROCHA, H. V. A. Efavirenz dissolution enhancement I: Co-micronization. **Pharmaceutics**, v. 5, n. 1, p. 1–22, 2013.

DESHMUKH, S.; AVACHAT, A.; GARKA, A.; KHURANA, N.; CARDOT, J.-M. Optimization of a Dissolution Method in Early Development Based on IVIVC Using Small Animals: Application to a BCS Class II Drug. **Dissolution Technologies**, v. 23, n. 4, p. 34–41, 2016.

DEZANI, A. B. Avaliação *in vitro* da solubilidade e da permeabilidade da lamivudina e da zidovudina. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica. **Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos da Universidade de São Paulo**, 2010. Disponível em: <<http://teses.usp.br>> Acesso em 24 abr. 2019

DEZANI, A. B.; PEREIRA, T. M.; CAFFARO, A. M.; REIS, J. M.; SERRA, C. H. DOS R. Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 67, n. 3, p. 194–202, 2013.

DIAKIDOU, A.; VERTZONI, M.; ABRAHAMSSON, B.; DRESSMAN, J.; REPPAS, C. Simulation of lipolysis and prediction of felodipine release from a matrix tablet in the fed stomach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.37, p., 2009, 37, 133-140.

DIAZ, D. A.; COLGAN, S. T.; LANGER, C. S.; BANDI, N.T.; LIKAR, M. D.; ALSTINE, L.V.; Dissolution similarity requirements: how similar or dissimilar are the global regulatory expectations? **The AAPS Journal**, v. 18, n. 1, p. 15-22, 2016.

DICKINSON, P. A.; LEE, W. W.; STOTT, P. W.; TOWNSEND, A. I.; SMART, J. P.; GHAMRAMANI, P.; HAMMETT, T.; BILLET, L.; BEHN, S.; GIBB, R. C.; ABRAHAMSSON, B. Clinical relevance of dissolution testing in quality by design. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 10, n. 2, p. 280-290, 2008.

DRESSMAN, J. B.; AMIDON, G. L.; REPPAS, C.; SHAH, V. P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 11-22, 1998.

DUNNE, A. Approaches to developing *in vitro in vivo* correlation models. IN: CHILUKURI D., SUNKARA G, YOUNG D. (EDS) Pharmaceutical Product Development: In vitro-*in vivo* correlation. Informa Health Care. Nova Iorque, 2007, 47-70p

DUNNE, A.; O'HARA, T.; DEVANE, J. A New approach to modelling the relationship between *in vitro* and *in vivo* drug dissolution / absorption. **Statistics in medicine**, v. 18, p. 1865-1876, 1999

ELKHABAZ, A.; SARKAR, S.; DINH, J. K.; SIMPSON, G. J.; TAYLOR, L. S. Variation in supersaturation and phase behavior of ezetimibe amorphous solid dispersions upon dissolution in different biorelevant media. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, p. 193-206, 2018.

EMAMI, J. *In vitro - in vivo* correlation: from theory to applications. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences**: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Society Canadienne des Sciences Pharmaceutiques, v. 9, n. 2, p. 169–189, 2006.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), guideline on the investigation of bioequivalence**, 2010. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu>>. Acesso em 10 jan. 2019

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms**. London, 2014. Disponível em: <<https://www.ema.europa.eu>> Acesso em 24 jan. 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry, dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms**. Rockville (MD): Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US Department of Health and Human Services; 1997a. Disponível em: <<http://www.fda.gov>> Acesso em 23 out. 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Draft guidance for industry, waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system**, Rockville (MD): Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US Department of Health and Human Service, 2015. Disponível em: <<http://www.fda.gov>> Acesso em 10 out. 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry. **Extended release oral dosage forms: development, evaluation and application of *in vitro/in vivo* correlations**. Rockville (MD): Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US Department of Health and Human Services; 1997. Disponível em: <<http://www.fda.gov>> Acesso em 10 out. 2018.

FOTAKI, N., SYMILLIDES, M., REPPAS, C. *In vitro versus* canine data for predicting input profiles of isosorbide-5-mononitrate from oral extended release products on a confidence interval basis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 115–122, 2005.

FOTAKI, N.; BROWN, W.; KOCHLING, J.; CHOKSHI, H.; MIAO, H.; TANG, K.; GRAY, V. Rationale for selection of dissolution media: Three case studies. **Dissolution Technologies**, v. 20, n. 3, p. 6–13, 2013.

FOTAKI, N.; VERTZONI, M. Biorelevant dissolution methods and their applications *in vitro in vivo* correlations for oral formulations. **The Open Drug Delivery Journal**, v. 4, p. 2-13, 2010.

FUCHS, A.; DRESSMAN, J. B. Composition and physicochemical properties of fasted-state human duodenal and jejunal fluid: A critical evaluation of the available data. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 11, p. 3398–3411, 2014.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS – FARMANGUINHOS. **Relatório de qualificação de performance para teste de dissolução do produto efavirenz 600 mg comprimido revestido**, junho, 2012.

GALIA, E.; NICOLAIDES, E.; HÖRTER, D.; LÖBENBERG, R.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J. B. Evaluation of various dissolution media for predicting *in vivo* performance of class I and II drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 5, p. 698–705, 1998.

GAO, Z., MOORE, T. W., DOUB, W. H.; WESTENBERGER, B.J.; BUHSE, L. F. Effects of Deaeration Methods on Dissolution Testing in Aqueous Media: A Study Using a Total Dissolved Gas Pressure Meter. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 7, 2006.

GILLESPIE, W. R. Convolution-based approaches for *in vivo* - *in vitro* correlation modeling. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, n. 423, p. 53 – 65, 1997.

GONZÁLEZ-GARCÍA, I.; MANGAS-SANJUÁN, V.; MERINO-SANJUÁN, M.; BERMEJO, M. *In vitro*–*in vivo* correlations: general concepts, methodologies and regulatory applications. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 12, p. 1935–1947, 2 dez. 2015.

GRAY, V. A., Dissolution Testing Using Fiber Optics – A Regulatory Perspective. **Journal of American Pharmaceutical Review**, v. 6, p. 26-30, 2006.

GU, C. H.; GANDHI, R. B.; TAY, L. K.; ZHOU, S., RAGHAVAN, K. Importance of using physiologically relevant volume of dissolution medium to correlate the oral exposure of formulations of BMS-480188 mesylate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p.195 – 202, 2004.

HE, X. Integration of Physical, Chemical, Mechanical, and Biopharmaceutical Properties in Solid Oral Dosage Form Development. . In: QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G.; YU, L.; MANTRI, R. V. (Eds.) **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice**. 2. ed. Cambridge: Elsevier Inc., 2009, p. 407–441.

HEIKKILA, T.; KARJALAINEN, M.; OJALA, K.; PARTOLA, K.; LAMMERT, F.; AUGUSTIJNS, P.; URTTI, A.; YLIPERTTULA, M.; PELTONEN, L.; HIRVONEN, J. Equilibrium drug solubility measurements in 96-well plates reveal similar drug solubilities in phosphate buffer pH 6.8 and human intestinal fluid. **International Journal of Pharmacy**, n. 405, v. 1–2, p. 132–136, 2011.

- HÖRTER, D.; DRESSMAN, J. B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 25, n. 1, p. 3–14, abr. 1997.
- INMAN, G. W., WETHINGTON, E., BAUGHMAN, K., HORTON, M., System Optimization for *In situ* Fiber-Optic Dissolution Testing. **Pharmaceutical Technology**, p. 92-100, 2001
- JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. J. Drug dissolution: Significance of physicochemical properties and physiological conditions. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 23–24, p. 1173–1184, 2013.
- JANTRATID, E.; DRESSMAN, J. Simulating the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update. **Dissolution Technologies**, August, p. 21–25, 2009.
- JANTRATID, E.; JANSSEN, N.; REPPAS, C.; DRESSMAN, J. B. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. **Pharmaceutical Research**.v. 25, n. 7, p. 1663–1676, 2008.
- KALANTZI, L.; GOUMAS, K.; KALIORAS, V.; ABRAHAMSSON, B.; DRESSMAN, J. B.; REPPAS, C. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 165-176, 2006.
- KAUKONEN, A. M.; BOYD, B. J.; PORTER, C. J. H.; CHARMAN, W. N. Drug solubilization behavior during *in vitro* digestion of simple triglyceride lipid solution formulations. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n.2, p. 245-253, 2004.
- KAUL, S.; J. I. P.; LU, M.; NGUYEN, K. L.; SHANGGUAN, T.; GRASELA, D. Bioavailability in healthy adults of efavirenz capsule contents mixed with a small amount of food. **American Journal Health-System Pharmacy**, v. 67, p. 217-222, 2010
- KAUR, N.; NARANG, A.; BANSAL, A. K. Use of biorelevant dissolution and PBPK modeling to predict oral drug absorption. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 129, p. 222-246, 2018.
- KLEIN, S. The use of biorelevant dissolution media to forecast the *in vivo* performance of a drug. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 3 p. 397-406, 2010.
- KLEIN, S.; DRESSMAN, J. B.; BUTLER, J.; HEMPENSTALL, J. M.; REPPAS, C. Media to simulate the postprandial stomach I. Matching the physicochemical characteristics of standard breakfasts. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 605-610, 2004.
- KLOEFER, B.; VAN HOOGEVEST, P.; MOLONEY, R.; KUENTZ, M.; LEIGH, M. L. S.; DRESSMAN, J. Study of a Standardized Taurocholate– Lecithin Powder for

Preparing the Biorelevant Media FeSSIF and FaSSIF. **Dissolution Technologies**, v. 17, n. 3, p. 6–13, 2010.

KOZIOLEK, M.; GARBACZ, G.; NEUMANN, M.; WEITSCHIES, W. Simulating the postprandial stomach: Physiological considerations for dissolution and release testing. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 5, p. 1610–1622, 2013.

KOZIOLEK, M.; GRIMM, M.; SCHNEIDER, F.; JEDAMZIK, P.; SAGER, M.; KOHN, P.; SIEGMUND, W.; WEITSCHIES, W. Navigating the human gastrointestinal tract for oral drug delivery: Uncharted waters and new frontiers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 101, p. 75–88, 2016.

LAMORDE, M.; BYAKIKA-KIBWIKI, P.; TAMALE, W.; KIWEEKA, F.; RYAN, M.; AMARA, A.; TIJA, J.; BACK, D.; KHOO, S.; BOFFITO, M.; KITYO, C.; MERRYL, C. Effect of Food on the Steady-State Pharmacokinetics of Tenofovir and Emtricitabine plus Efavirenz in Ugandan Adults. **AIDS Research and Treatment**, 2012.

LAVRA, Z. M. M.; SANTANA, D. P.; RÉ, M. I. Solubility and dissolution performances of spray-dried solid dispersion of efavirenz in soluplus. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 1, p. 42–54, 2017.

LAWRENCE, G. L.; AMIDON, A. Compartmental absorption and transit model for estimating oral drug absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 186, p. 119–125, 1999.

LEHTO, P.; KORTEJARVI, H.; LIIMATAINEN, A.; OJALA, K.; KANGAS, H. HIRVONEN, J.; TAINNEN, V. P.; PELTONEN, L. Use of conventional surfactant media as surrogates for FaSSIF in simulating *in vivo* dissolution of BCS class II drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 78, n. 1, p. 531–538, 2011.

LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 3, p. 273–285, 2005.

LIU, J. P.; MA, M. C.; CHOW, S. C. Statistical evaluation of similarity factor F2 as a criterion for assessment of similarity between dissolution profiles. **Drug Information Journal**, v. 31, p. 1255–1271, 1997.

LIU, L., FITZGERALD, G., EMBRY, M., CANTU, R., PACK, B., Technical evaluation of a fiber-optic probe dissolution system. **Dissolution Technologies**, n. 15, v. 1, p. 10–20, 2008.

LIU, L.; OSEI, T.; HSU, J.; GREYLING, J. Evaluation of In-Situ Fiber Optics Dissolution Method for Compound A Extended Release Tablets, **American Pharmaceutical Review**, 2011.

LIU, Z.; WANG, S.; HU, M. Oral Absorption Basics: Pathways, Physico-chemical and Biological Factors Affecting Absorption. . In: QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G.; YU, L.; MANTRI, R. V. (Eds.) **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice**. 2. ed. Cambridge: Elsevier Inc., 2009, p. 265–288.

LÖBENBERG, R.; AMIDON, G. L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 3–12, 2000.

LONG, M.; CHEN, Y. Dissolution Testing of Solid Products. In: QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G.; YU, L.; MANTRI, R. V. (Eds.) **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice**. 2. ed. Cambridge: Elsevier Inc., 2009. p. 319–340.

LOO, J.; RIEGELMAN, S. New method for calculating the intrinsic absorption rate of drugs . **Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 57, p. 918 – 928, 1968.

LU, Y.; KIM, S.; PARK, K. *In vitro*–*in vivo* correlation: Perspectives on model development. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 142–148, 2011.

LUE, B. M.; NIELSEN, F. S.; MAGNUSSEN, T.; SCHOU, H. M.; KRISTENSEN, K.; JACOBSEN, L. O.; MÜLLERTZ, A. Using biorelevant dissolution to obtain IVIVC of solid dosage forms containing a poorly-soluble model compound. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 648–657, jun. 2008.

MACHERAS, P.; KOUPPARIS, M.; TSAPROUNIS, C. Drug dissolution studies in milk using the automated flow injection serial dynamic dialysis technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 33, n. 1–3, p.125–36, 1986..

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 4, 2002.

MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. **Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**, 2003. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>> Acesso em 13 out. 2018.

MARQUES, M. R. C.; LOEBENBERG, R.; ALMUKAINZI, M. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. **Dissolution Technologies**, v. 18, n. 3, p. 15–28, 2011.

MARTINEZ, M.; AMIDON, G. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, p. 620–643, 2002.

- MARTINS, E.S. Farmacocinética do Efavirenz administrado na forma de nanopartículas inorgânicas em coelhos. **Dissertação submetida ao Programa De Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Paulista**, 2018. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br>> Acesso em 14 out. 2018.
- MAUGER, J. W. Physicochemical Properties of Buffers Used in Simulated Biological Fluids with Potential Application for *In vitro* Dissolution Testing: A Mini-review. **Dissolution Technologies**, v. 24, n. 3, p. 38–51, 2017.
- MIRZA, T., LIU, Q., VIVILECCHIA, R., JOSHI, Y., Comprehensive Validation Scheme for *In situ* Fiber Optics Dissolution Method for Pharmaceutical Drug Product Testing. **Journal of Pharmaceutical. Sciences**, v. 98, n. 3, p. 1086-1094, 2009.
- MISHRA, V.; GUPTA, U.; JAIN, N. K. Biowaiver: An alternative to *in vivo* pharmacokinetic bioequivalence studies. **Pharmazie**, v. 65, n. 3, p. 155–161, 2010.
- MITRA, A.; PETEK, B; BAJC, A; VELAGAPUDI, R.; LEGEN, I. Physiologically based absorption modeling to predict bioequivalence of controlled release and immediate release oral products. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 134, p. 117-125, 2019.
- MOURÃO, S. C. Correlação *in vitro-in vivo* para formas farmacêuticas sólidas de liberação modificada contendo diclofenaco de sódio. **Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**, 2009. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br>> Acesso em 18 out. 2018.
- NIR, I; LU, X. *In situ* UV fiber optics for dissolution testing: what, why, and where we are after 30 years. **Dissolution Technologies**, n.8. 2018, p.70-77
- NORRIS D.A.; LEESMAN, G.D.; SINKO, P.J.; GRASS, G.M. Development of predictive pharmacokinetic simulation models for drug discovery. **Journal of Controlled Release**, v. 65, p. 55-62, 2000.
- OLIVEIRA, J. A. Farmacocinética do Efavirenz em coelhos: Estudo comparativo de formas farmacêuticas sólidas. 2018. **Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista**, 2018. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br>> Acesso em 15 dez. 2018.
- OLIVERIA, M. E.; MANZO, R. H. O sistema de classificação biofarmacêutica e as bioisenções. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. (Eds.) **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 351.
- OTSUKA, K.; SHONO, Y.; DRESSMAN, J. Coupling biorelevant dissolution methods with physiologically based pharmacokinetic modelling to forecast in-vivo performance of solid oral dosage forms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, n. 7, p. 937–952, 2013.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N. S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 201, n. 2, p. 131–150, 2000.

PINTO, E. C.; CABRAL, L. M.; DE SOUSA, V. P. Development of a discriminative intrinsic dissolution method for efavirenz. **Dissolution Technologies**, v. 21, n. 2, p. 31–40, 2014.

POLLI, J. E. IVIVR versus IVIVC. **Dissolution Technologies**, v. 7, n. 3, p. 6-9, 2000.

POLLI, J. E.; CRISON, J. R.; AMIDON, G. L. Novel approach to the analysis of *in vitro*–*in vivo* relationships. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, n. 7, p. 753–760, 1996.

PORCHE, D. J. Efavirenz. **Journal of the Association of Nurses in AIDS care**, v. 11, n. 3, p. 95-98, 2000.

PORTER, C. J. H.; TREVASKIS, N. L.; CHARMAM, W. N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 231-248, 2007.

PSACHOULIAS, D.; VERTZONI, M.; GOUMAS, K.; KALIORAS, V.; BEATO, S.; BUTLER, J.; REPPAS C. Precipitation in and supersaturation of contents of the upper small intestine after administration of two weak bases to fasted adults. **Pharmaceutical Research**, n. 28, v. 12, p. 3145–3158, 2011.

QIU, J.; MARTINEZ, M.; TIWARI, R. Evaluating *in vitro*–*in vivo* correlation using a bayesian approach. *The AAPS Journal*, v. 18, n. 3, p. 619-634, 2016

QIU, Y. *In vitro*–*In vivo* Correlations: fundamentals, development considerations and applications. In: QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G.; YU, L.; MANTRI, R. V. (Eds.) **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice**. 2. ed. Cambridge: Elsevier Inc., 2009, p. 379–406.

RABEL, S. R.; MAURIN, M. B.; ROWE, S. M.; HUSSAIN, M. Determination of the pKa 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 Technology**, v. 1, n. 1, p. 91-95, 1996.

RANGEL-YAGUI C.O.; PESSOA, A.; TAVARES, L.C. Micellar solubilization of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, n. 2, p. 147-163, 2005

RIETHORST, D.; MOLS, R.; DUCHATEAU, G.; TACK, J.; BROUWERS, J.; AUGUSTIJNS, P. Characterization of Human Duodenal Fluids in Fasted and Fed State Conditions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 2, p. 673–681, 2016.

RODRIGUES, W. C.; SOLER, O. Licença compulsória do efavirenz no Brasil em 2007: contextualização. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 26, n. 6, p. 553-559, 2009.

ROSENBAUM, S. Compartmental Models in Pharmacokinetics. In: ROSENBAUM, S. (Ed) **Basic Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: an integrated textbook and computer simulations**. John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey, 2017, 145-157p.

ROSENBERGER, J.; BUTLER, J.; DRESSMAN, J. B. A Refined Developability Classification System. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, n. 8, p. 2020–2032, ago. 2018.

ROWE, S., FONTALBERT, L., RABEL, S.; MAURIN, M. Physical chemical properties of efavirenz. **The AAPS Journal: Annual Meeting Abstracts**, S1, n. 1, p. 1005, 1999.

SATHE, P. M.; TSONG, Y.; SHAH, V. P. *In vitro* dissolution profile comparison: statistics and analysis, model dependent approach. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 12, p. 1799-1803, 1996.

SCHWEBEL, H. J.; VAN HOOGEVEST, P.; LEIGH, M. L. S.; KUENTZ, M. The apparent solubilizing capacity of simulated intestinal fluids for poorly water-soluble drugs. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 16, n. 3, p. 278-286, 2011.

SEKAR, V. J.; REYNOLDS, K. Clinical pharmacology and biopharmaceutics review: application number 20972. **Center for Drug Evaluation and Research**. Estados Unidos, 1998. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/20972biopharm_review.pdf

SHAH, V. P.; TSONG, Y.; SATHE, P.; LIU, J. P. *In vitro* dissolution profile comparison – statistics and analysis of the similarity factor F2. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 889-896, 1998.

SHARGEL, L.; ANDREW, Y. Nonlinear Pharmacokinetics. In **Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**. Stamford, Connecticut, 1999. p449-474

SHEN, J.; BURGESS, D. J. *In vitro-in vivo* correlation for complex non-oral drug products: where do we stand? **Journal of Controlled Release**. *Control Release*, v. 10, n. 219, p. 644-651, 2015

SILVA, M. F. Correlação *in vitro- in vivo* de comprimidos matriciais de furosemda complexada à hidroxipropil- β -ciclodextrina: métodos *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. **Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**, 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>> Acesso 08 jan. 2019.

SILVA, M. F.; HUERTA, C. M.; BARBOSA, J. M.; PORTA, V.; Serra, C. H. R. *In vitro-in vivo* Correlation: Modified release tablets containing furosemide complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **AAPS Annual Meeting and Exposition**, San Antonio, 2013.

SIMULATIONS PLUS, Manual GastroPlus™, California, EUA, 2010

SKELLY, J. P. Bioavailability and Bioequivalence. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 16, n. 10, p. 539–545, out. 1976.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2005.

STORPIRTIS, S.; OLIVEIRA, P. G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 35, n. 1, p. 1–16, 1999.

TAKANO, R. SUGANO, K; HIGASHIDA A.; HAYASHI, Y; MACHIDA, M.; ASO, Y; YAMASITA, Y. Oral absorption of poorly water-soluble drugs: computer simulations of fraction absorbed in humans from a miniscale dissolution test. **Pharmaceutical Research**, n. 23, v. 6, p. 1144-1156, 2006.

TERSTAPPEN, G. C.; REGGIANI A. *In silico* research in drug discovery. **Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 23-26, 2006.

The United States Pharmacopoeia (USP) General Notices. 2011. **Testing Practices and Procedures. Section 6.30**. USP39 – NF34. Rockville, MD. USA: U.S. Pharmacopeial Convention Inc.2016

TAUBERT, M; EBERT, N; VAN DER GIET, M.; FUHR, U.; SCHAEFFNER, E. Using a three-compartment model improves the estimation of iohexol clearance to assess glomerular filtration rate. **Nature Scientific Report**, v. 8, n. 17723, p. 1-8, 2018.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. Farmacocinética e Farmacodinâmica. IN: TOZER, T. N.; ROWLAND, M. **Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica**. Porto Alegre: Artmed, 2009, p. 2-25.

VAN DEN ABEELE J.; BROUWERS, J.; MATTHEUS, R.; TACK, J.; AUGUSTIJNS, P.; Gastrointestinal behavior of weakly acidic BCS class II drugs in man — case study diclofenac potassium, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 2, p. 687-696, 2015.

VENG-PEDERSEN , P.; GOBBURU, J. V. S.; MEYER, M. C.; STRAUGHN, A. B. Carbamazepine level-A *in vivo* - *in vitro* correlation (IVIVC): a scaled convolution based predictive approach . **Biopharmaceutical Drug Disposition**, n. 21, v. 1, p. 1 – 6, 2000.

VERTZONI, M.; DRESSMAN, J.; BUTLER, J.; HEMPENSTALL, J.; REPPAS, C. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the *in vivo* dissolution of lipophilic compounds. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 3, p. 413–417, ago. 2005.

VERTZONI, M.; MARKOPOULOS, C.; SYMILLIDES, M.; GOUMAS, C.; IMANIDIS, G.; REPPAS, C. Luminal lipid phases after administration of a triglyceride solution of danazol in the fed state and their contribution to the flux of danazol across Caco-2 cellmonolayers. **Molecular Pharmacy**, n. 9, v. 5, p. 1189– 1198, 2012.

WAGNER, J.G. Pharmacokinetic absorption plots from oral data alone or oral/intravenous data and an exact Loo–Riegelman equation . **Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 72, p. 838 – 842, 1983.

WALSH, P. L.; BOTHE, J. R.; BHARDWAJ, S.; HU, M.; NOFSINGER, R.; XIA, B.; PERSAK, S.; PENNINGTON, J.; BAK, A. A canine biorelevant dissolution method for predicting *in vivo* performance of orally administered sustained release matrix tablets. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 5, p. 836–844, 2016.

WANG, J.; FLANAGAN, D. R. Fundamentals of Dissolution. In: QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G.; YU, L.; MANTRI, R. V. (Eds.) **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice**. 2. ed. Cambridge: Elsevier Inc., 2009, p. 309–318.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO technical report series, N° 992, Annex 7. **Multisource (Generic) pharmaceutical products: guidelines registration requirements to establish interchangeability**, 2015. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21898en/s21898en.pdf>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Updated recommendations on first-line and second-line antiretroviral regimens and post-exposure prophylaxis and recommendations on early infant diagnosis of HIV**, 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/hiv/pub/guidelines/ARV2018update/en/>> Acesso em 24 abr. 2019.

YANG, J.; GREY, K.; DONEY, J. An improved kinetics approach to describe the physical stability of amorphous solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 384, n. 1–2, p. 24–31, 2010.

YASUSHI, S.; JANTRATID, E.; JANSSEN, N.; KESISOGLOU, F.; MAO, Y. Prediction of food effects on the absorption of celecoxib based on biorelevant dissolution testing coupled with physiologically based pharmacokinetic modeling. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, p. 107-144, 2009.

YU, L. X. An integrated model for determining causes of poor oral drug absorption. **Pharmaceutica Research**, v. 16. 1999.

YUSKEL, N.; KANIK, A. E.; BAYKARA, T. Comparison of *in vitro* dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independent methods. **International Journal of Pharmacy**, v. 209, p. 57-67, 2000.

10 ANEXO I. DADOS FISIOLÓGICOS UTILIZADOS COMO ENTRADA PARA PREDIÇÃO *IN SILICO*

Tabela 18: Dados fisiológicos utilizados na predição *in silico* da biodisponibilidade do EFV.

Compart.	ASF	pH		Tempo de Trânsito (h)	Volume (mL)		Comp. (cm)	Raio (cm)	SEF		Sais biliares (mM)		Porosidade (cm ⁻¹)
		Jejum	Alim.		Jejum	Alim.			Jejum	Alim.	Jejum	Alim.	
Estômago	0,00	1,30	4,90	0,25	42,77	855,50	27,16	9,45	1,00	1,00	0,00	0,00	2,58
Duodeno	2,85	6,00	5,40	0,25	38,18	38,18	13,56	1,50	4,24	4,24	2,80	14,44	48,64
Jejuno 1	2,82	6,20	5,40	0,92	140,30	140,30	56,07	1,41	3,95	3,95	2,33	12,02	38,90
Jejuno 2	2,79	6,40	6,00	0,73	112,40	112,40	56,07	1,26	3,49	3,49	2,03	10,46	26,09
Íleo 1	2,78	6,60	6,60	0,57	85,78	84,78	56,07	1,10	3,03	3,03	1,41	7,28	16,46
Íleo 2	2,72	6,90	6,90	0,41	65,00	65,00	56,07	0,96	2,57	2,57	1,16	5,99	9,54
Íleo 3	2,69	7,40	7,40	0,29	45,62	45,62	56,07	0,80	2,11	2,11	0,14	0,73	4,90
Ceco	1,75	6,40	6,40	3,97	43,88	43,88	12,74	3,31	1,79	1,79	0,00	0,00	2,92
Cólon Asc.	3,76	6,80	6,80	11,91	46,52	46,52	26,66	2,36	2,48	2,48	0,00	0,00	3,22

Cólon Asc. – cólon ascendente; ASF – escala do fator de absorção; Alim. – alimentação; Comp. – comprimento; SEF – fatores de aprimoramento da área superficial (medida da área de superfície de absorção em cada compartimento).

11 ANEXO II. CURVA ANALÍTICA DE EFV EM ACETONITRILA/ÁGUA (1:1) E RELATÓRIO ESTATÍSTICO

Tabela 19: Dados da curva analítica para quantificação de EFV por CLAE/UV

Concentração (mg/mL)	ASC			Média	DP	DPR
	1	2	3			
0,0008	44494	48077	39904	44158	4096,83	9,3%
0,0025	207459	208839	195264	203854	7471,09	3,7%
0,0082	417256	402500	402507	407421	8517,36	2,1%
0,0411	2073760	2069378	2094446	2079195	13388,53	0,6%
0,0822	4151488	4160667	4094596	4135584	35791,83	0,9%
0,1232	6160133	6074407	6035799	6090113	63637,60	1,0%
0,1643	7438411	7413562	7377755	7409909	30492,52	0,4%

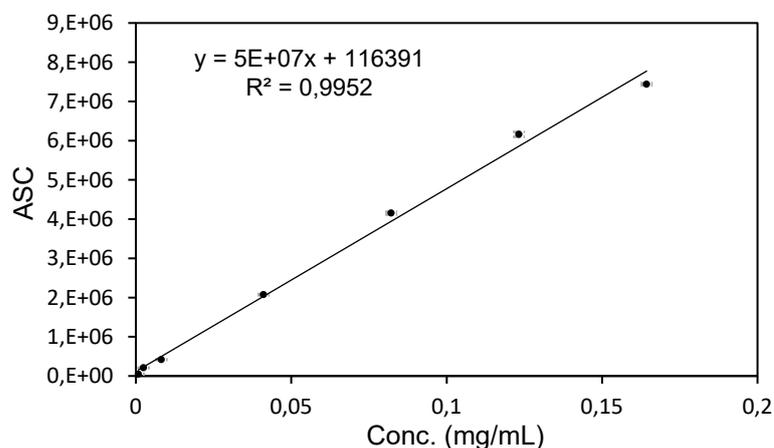


Figura 16: Curva de regressão linear para o EFV em CLAE/UV

Tabela 20: Resumo da avaliação estatística da curva analítica.

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto igual a zero
Coeficiente de Correlação de Pearson	R = 0.997 que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não detectamos pontos extremos
Teste de independência das observações	Não detectamos dependência das observações

12 ANEXO III. DADOS DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO

Tabela 21: Dados dos perfis de dissolução do efavirenz em meios biorrelevantes e LSS 0,5% obtido por quantificação por sonda de UV *in situ*. Os dados são apresentados como média de três replicatas independentes.

Tempo (min)	LSS 0,5%			FaSSIF			FaSSIF-V2			FeSSIF			FeSSIF-V2		
	Média (%)	DP	DPR												
0	0	0		0	0		0	0		0	0		0	0	
5	9,60	0,47	4,88%	5,44	0,23	4,22%	1,98	0,13	6,72%	10,01	0,31	3,10%	6,72	0,07	1,04%
10	37,62	0,26	0,69%	11,02	0,04	0,33%	4,02	0,08	2,01%	20,54	0,16	0,78%	11,54	0,09	0,78%
15	63,79	0,17	0,26%	13,22	0,03	0,25%	4,41	0,03	0,68%	27,32	0,12	0,44%	12,95	0,12	0,93%
20	78,80	0,09	0,12%	14,43	0,03	0,18%	4,52	0,02	0,49%	32,54	0,10	0,31%	13,52	0,14	1,04%
30	87,16	0,05	0,06%	15,67	0,02	0,10%	4,68	0,02	0,45%	39,70	0,08	0,20%	13,87	0,11	0,79%
45	87,64	0,04	0,05%	16,29	0,02	0,10%	4,78	0,02	0,38%	46,04	0,07	0,15%	14,21	0,13	0,91%
60	87,92	0,05	0,05%	16,51	0,02	0,10%	4,89	0,01	0,27%	49,76	0,06	0,12%	14,05	0,19	1,35%
90	87,89	0,04	0,05%	16,67	0,02	0,10%	5,05	0,01	0,26%	52,71	0,06	0,11%	14,18	0,15	1,06%
120	91,01	0,05	0,05%	16,67	0,02	0,10%	5,17	0,01	0,25%	55,68	0,05	0,09%	14,07	0,14	1,00%
150	91,01	0,05	0,05%	16,67	0,02	0,10%	5,17	0,01	0,25%	55,68	0,05	0,09%	14,07	0,14	1,00%

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo

Tabela 22: Dados dos perfis de dissolução do efavirenz em meios biorrelevantes e LSS 0,5% obtido por quantificação em CLAE/UV. Os dados são apresentados como média de três replicatas independentes.

Tempo (min)	LSS 0,5%			FaSSIF			FaSSIF-V2			FeSSIF			FeSSIF-V2		
	Média (%)	DP	DPR	Média (%)	DP	DPR	Média (%)	DP	DPR	Média (%)	DP	DPR	Média (%)	DP	DPR
0	0	0		0	0		0	0		0	0		0	0	
5	9,86	0,82	8,29%	2,34	0,44	18,83%	1,39	0,12	8,63%	11,38	1,09	9,61%	15,01	2,27	15,15%
10	40,25	1,81	4,49%	8,78	1,62	18,40%	3,61	0,19	5,51%	22,95	2,31	10,04%	25,40	1,10	4,33%
15	65,56	2,15	3,28%	11,95	1,32	11,06%	4,40	0,15	3,39%	29,38	3,10	10,55%	33,21	0,97	2,91%
30	84,69	2,98	3,51%	14,80	0,80	5,38%	4,58	0,14	3,16%	43,43	2,78	6,40%	51,12	2,92	5,72%
45	91,38	1,59	1,74%	15,28	0,28	1,83%	4,57	0,12	2,57%	53,19	3,18	5,98%	61,20	2,82	4,60%
60	92,84	4,33	4,66%	15,57	0,33	2,11%	4,56	0,10	2,19%	60,92	2,98	4,89%	70,68	3,30	4,66%
90	94,49	1,16	1,23%	15,65	0,38	2,45%	4,52	0,12	4,14%	70,34	2,96	4,21%	80,41	4,51	5,60%
120	94,01	0,11	0,12%	15,73	0,11	0,70%	4,43	0,18	4,09%	76,75	4,14	5,39%	84,96	3,43	4,04%
150	97,99	0,70	0,72%	15,73	0,11	0,70%	4,35	0,14	3,26%	82,06	3,48	4,24%	89,41	3,19	3,57%
180	98,12	0,90	0,92%	15,73	0,11	0,70%	4,35	0,14	3,26%	85,20	4,28	5,03%	90,91	4,60	5,06%

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo