



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MAIRA LUDNA DUARTE

**QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANTIRRETROVIRAIS EM *DRIED*  
*BLOOD SPOT* E PLASMA UTILIZANDO LC-MS/MS: farmacocinética e  
monitorização terapêutica de efavirenz em gestantes**

RECIFE

2022

MAIRA LUDNA DUARTE

**QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANTIRRETROVIRAIS EM *DRIED*  
*BLOOD SPOT* E PLASMA UTILIZANDO LC-MS/MS: farmacocinética e  
monitorização terapêutica de efavirenz em gestantes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Área de concentração:** Fármacos e Medicamentos.

**Orientadora:** Prof<sup>o</sup>. Dra. Leila Bastos Leal

**Co-orientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Danilo Cesar Galindo Bedor

RECIFE

2022

Catálogo na Fonte  
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

D812q Duarte, Maira Ludna.  
Quantificação simultânea de antirretrovirais em dried blood spot e plasma utilizando LC-MS/MS : farmacocinética e monitorização terapêutica de efavirenz em gestantes / Maira Ludna Duarte. – 2022.  
105 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientadora : Leila Bastos Leal.  
Coorientador : Danilo Cesar Galindo Bedor.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2022.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. HIV. 2. Gravidez. 3. Terapia Antirretroviral de Alta Atividade. 4. Monitoramento de Medicamentos. 5. Teste em Amostras de Sangue Seco. I. Leal, Leila Bastos (Orientadora). II. Bedor, Danilo Cesar Galindo. III. Título.

615 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2022-192)

MAIRA LUDNA DUARTE

**QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANTIRRETROVIRAIS EM *DRIED*  
*BLOOD SPOT* E PLASMA UTILIZANDO LC-MS/MS: farmacocinética e  
monitorização terapêutica de efavirenz em gestantes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Área de concentração:** Fármacos e Medicamentos.

Aprovada em: 03/03/2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Danilo Cesar Galindo Bedor (Presidente)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Davi Pereira de Santana (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Perrelli Randau (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Fernando José Malagueño de Santana (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Luiz Claudio Arraes de Alencar (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho aos meus pais, ao meu tio Adonias (*in memoriam*) e minha avó Dona (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, pelas bênçãos, oportunidades e força.

Aos meus pais, Agivan e Maria do Carmo, meu porto seguro e fortaleza, minha razão para seguir em frente, vencendo os obstáculos. Obrigada por me ensinarem que estudar é o caminho, orientando e provendo meios para que isso fosse possível. Vocês são minha motivação para sempre buscar e dar o que há de melhor em mim.

Ao meu irmão, Eduardo, pela cumplicidade, carinho e cuidado de toda uma vida.

À toda a minha família, meus tios e primos, que me motivam e me proporcionam sempre um ambiente agradável e feliz. É uma enorme alegria ser motivo de orgulho para vocês.

À minha orientadora, a professora Dra. Leila Leal, pelo acolhimento e viabilização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, o professor. Dr. Danilo Bedor, pelo acolhimento, paciência e orientação indispensável para a realização deste trabalho.

Aos professores colaboradores, Dr. Luiz Arraes, Dr. Victor Whocely, Dra. Cristina Sanches e Dr. Davi Santana, por todo o suporte e orientação dedicados a este trabalho.

Aos meus amigos por todos os momentos compartilhados, pela amizade e por sempre se fazerem presentes.

Aos amigos do NUDFAC, Wellithom, Juliana, Ana Rosa, Carol Costa, Alelia e Aurylanne. Vocês foram muito importantes nesta caminhada, cada um deu sua contribuição para realização deste trabalho. Obrigada por toda a ajuda, acolhimento, amizade e momentos compartilhados.

Às participantes dos estudos clínicos, sem vocês nada disso seria possível. Obrigada pela disponibilidade, confiança e por despertarem meu olhar humanizado em meio às rotinas experimentais instrumentais.

Ao NUDFAC, pelo suporte técnico e financeiro.

Aos funcionários do PPGCF, Nerilin e Rilvan.

Aos funcionários da FECDA.

À FACEPE pela concessão da bolsa de doutorado.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## RESUMO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2020, havia 1,3 milhão de gestantes vivendo com HIV, das quais aproximadamente 85% receberam medicamentos antirretrovirais para prevenir a transmissão vertical. As alterações fisiológicas induzidas pela gestação ocasionam mudanças na farmacocinética materna, sugerindo potencial variabilidade nas concentrações plasmáticas de antirretrovirais durante este período. Portanto, gestantes podem ser expostas a concentrações subterapêuticas desses fármacos, o que pode aumentar o risco de transmissão vertical do HIV. Essas alterações farmacocinéticas e a possibilidade de não adesão sugerem potencial aplicação para monitorização terapêutica. O presente estudo teve como objetivo desenvolver e validar um método por LC-MS/MS sensível para quantificação simultânea de efavirenz, raltegravir, atazanavir e ritonavir em *dried blood spot* (DBS) e plasma humano para aplicação em estudos de farmacocinética e motorização terapêutica. Os analitos foram extraídos do DBS com uma mistura de metanol: sulfato de zinco 200 mM 50:50 v/v/ e 100% de metanol para amostras de plasma, seguido de separação cromatográfica em uma coluna Shim-pack® C18, 4,6 mm×150 mm, 5 µm. A detecção foi realizada em um espectrômetro de massas 3200-QTRAP® com ionização por eletronebulização e detecção através da monitorização de reações múltiplas, com tempo de corrida de 6 min. O método mostrou-se seletivo frente aos interferentes do sangue seco e do plasma, linear na faixa de 15 - 1.000 ng/mL para raltegravir, 50 - 10.000 ng/mL para atazanavir e ritonavir, 50 - 5.000 ng/mL para efavirenz. A precisão e a exatidão foram inferiores a 15% para todos os analitos nos níveis de concentração avaliados. Raltegravir, atazanavir e ritonavir foram estáveis até sete dias a 23 °C e 40 °C, enquanto o efavirenz foi estável até vinte e quatro horas nas mesmas temperaturas. O método foi aplicado com sucesso em amostras de sangue seco em papel e de plasma obtidas de sete gestantes infectadas pelo HIV-1 em tratamento com associação de três antirretrovirais – tenofovir (300mg), lamivudina (300mg) e efavirenz (600mg). A avaliação da correlação entre as concentrações obtidas nas amostras coletadas em DBS e em plasma mostrou-se linear de acordo com as análises de Passing-Bablok e de Bland-Altman. Os valores de concentração determinados nas amostras para fins de monitorização terapêutica do efavirenz mostraram-se fora do intervalo terapêutico em todas as participantes.

Palavras-chave: hiv; gravidez; terapia antirretroviral de alta atividade; monitoramento de medicamentos; teste em amostras de sangue seco.

## ABSTRACT

According to the World Health Organization, in 2020, there were 1.3 million pregnant women living with HIV, of whom approximately 85% received antiretroviral drugs to prevent mother-to-child transmission. The specific physiological background induced by pregnancy leads to significant changes in maternal pharmacokinetics, suggesting potential variability in plasma concentrations of antiretrovirals during gestation. Therefore, pregnant women may be exposed to subtherapeutic concentrations of antiretroviral agents, which may increase the risk of HIV transmission from mother to child. These pharmacokinetic changes in pregnancy and the possibility of nonadherence suggest a possible role for routine therapeutic drug monitoring. The present study aimed at developing and validating a sensitive LC–MS/MS method for simultaneous quantification of efavirenz, raltegravir, atazanavir, and ritonavir in dried blood spot (DBS) and plasma. Analytes were extracted from whole DBS punch with a mixture of methanol: zinc sulfate 200 mM 50:50 v/v and 100% methanol for plasma samples, followed by chromatographic separation in a Shim-pack<sup>®</sup> C18, 4.6 mm×150 mm, 5 μm column. Detection was performed in a 3200-QTRAP<sup>®</sup> mass spectrometer with electrospray ionization and detection by monitoring multiple reactions, with a run time of 6 min. The assay was selective against DBS and plasma interferences, linear in the range of 15 - 1,000 ng/mL for raltegravir, 50 - 10,000 ng/mL for both atazanavir, and ritonavir, 50 - 5,000 ng/mL for efavirenz. Precision and accuracy at the concentration levels were less than 15% for all analytes. Raltegravir, atazanavir, and ritonavir were stable up to seven days at 23 °C and 40 °C, whereas efavirenz was stable up to twenty-four hours at the same temperatures. The method was successfully applied to DBS and plasma samples obtained from seven HIV-1 infected pregnant volunteer outpatients prescribed with an association of three antiretrovirals – tenofovir (300mg), lamivudine (300mg), and efavirenz (600mg). The evaluation of the correlation between the concentrations obtained in the samples collected in DBS and in plasma showed to be linear according to the Passing-Bablok and Bland-Altman analyses. The concentration values determined in the samples for the purposes of therapeutic monitoring proved to be outside the therapeutic range for all participants.

**Keywords:** hiv; pregnancy; antiretroviral therapy highly active; drug monitoring; dried blood spot testing.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema ilustrativo da estrutura do HIV e seus principais constituintes. ....	21
<b>Figura 2</b> - Desenho esquemático da estrutura e organização do genoma do HIV-1.....	22
<b>Figura 3</b> - Ilustração do ciclo de replicação do HIV.....	23
<b>Figura 4</b> - Estrutura química do efavirenz (315,03 g/mol). ....	32
<b>Figura 5</b> - Cartão de coleta contendo amotras de sangue seco. A área delimitada pela linha tracejada corresponde à area destacada para fins de extração, análise e quantificações dos analitos. ....	46
<b>Figura 6</b> - Cromatogramas do RAL, ATZ, RTV, EFZ e PI: (a) branco DBS, (b) branco plasma, (c) LIQ RAL, (d) LIQ ATZ, (e) LIQ RTV, (f) LIQ EFZ, (g) PI e (h) LIQ Simultâneo.....	61
<b>Figura 7</b> - Cromatogramas obtidos na avaliação qualitativa do efeito matriz em amostras de DBS (a) e plasma (b). ....	72
<b>Figura 8</b> - Análise de regressão de Passing-Bablok (1), respectivo gráfico de resíduos (2), e gráfico de Bland-Altman (3) das concentrações medidas em: (a) DBS central e periférico, (b) DBS central e plasma, (c) DBS periférico e plasma. ....	79
<b>Figura 9</b> - Análise de regressão de Passing-Bablok (1), respectivo gráfico de resíduos (2), e gráfico de Bland-Altman (3) das concentrações medidas em: (a) DBS central e periférico, (b) DBS central e plasma, (c) DBS periférico e plasma. ....	80
<b>Figura 10</b> - Gráficos de diagnóstico das concentrações de EFZ observadas versus previstas por indivíduo (esquerda) e para a população (direita) e Verificação de Predição Visual (abaixo). ....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Condições espectrométricas utilizadas para monitoramento das transições de massa no modo MRM para raltegravir (RAL), atazanavir (ATZ), ritonavir (RTV), efavirenz (EFV) e lopinavir (PI). .....	57
<b>Tabela 2</b> - Composição do gradiente da fase móvel utilizado no método bioanalítico. ....	59
<b>Tabela 3</b> - Condições cromatográficas finais do método bioanalítico desenvolvido.....	60
<b>Tabela 4</b> - Recuperação média dos analitos em DBS. ....	60
<b>Tabela 5</b> - Recuperação média dos analitos em plasma. ....	61
<b>Tabela 6</b> - Valores de coeficiente de correlação ( $r^2$ ) para os intervalos lineares dos analitos em DBS e plasma. ....	62
<b>Tabela 7</b> - Linearidade em amostras de DBS para o RTV. ....	63
<b>Tabela 8</b> - Linearidade em amostras de DBS para o ATZ. ....	63
<b>Tabela 9</b> - Linearidade em amostras de DBS para o RAL. ....	64
<b>Tabela 10</b> - Linearidade em amostras de DBS para o EFZ. ....	64
<b>Tabela 11</b> - Linearidade em amostras de plasma para o RTV. ....	65
<b>Tabela 12</b> - Linearidade em amostras de plasma para o ATZ. ....	65
<b>Tabela 13</b> - Linearidade em amostras de plasma para o RAL. ....	66
<b>Tabela 14</b> - Linearidade em amostras de plasma para o EFZ. ....	66
<b>Tabela 15</b> - Precisão e exatidão inter e intracorrida da quantificação dos analitos em amostras de DBS. ....	68
<b>Tabela 16</b> - Precisão e exatidão inter e intracorrida da quantificação dos analitos em amostras de plasma. ....	69
<b>Tabela 17</b> - Efeito matriz (EM), recuperação (REC) e eficiência do processo (EP) para os analitos em amostras de DBS. ....	70
<b>Tabela 18</b> - Efeito matriz (EM), recuperação (REC) e eficiência do processo (EP) para os analitos em amostras de plasma. ....	71
<b>Tabela 19</b> - Fator de Matriz Normalizado (FMN) para os analitos em amostras de DBS e plasma. ....	73
<b>Tabela 20</b> - Estabilidade dos analitos em amostras de plasma. ....	75
<b>Tabela 21</b> - Estabilidade dos analitos em amostras de DBS. ....	76
<b>Tabela 22</b> - Descrição das características demográficas e clínicas das participantes incluídas nos estudos de modelagem farmacocinética populacional e de monitorização terapêutica do EFZ. ....	81

**Tabela 23** - Estimativas dos parâmetros farmacocinéticos de EFZ para o modelo final. ....83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARV	Antirretrovirais
ATZ	Atazanavir
AZT	Azidotimidina ou Zidovudina
CCR5	Co-receptor de quimiocina tipo 5
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CV	Coeficiente de Variação
CV-HIV	Carga Viral do HIV
DBS	<i>Dried Blood Spot</i>
DC	Corrente Contínua
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EFZ	Efavirenz
EP	Eficiência do Processo
ER	Erro Relativo
ESI	Eletronebulização
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMN	Fator de Matriz Normalizado
GP	Glicoproteína
IF	Inibidor de Fusão
IP	Inibidores de Protease
ITRN	Inibidores da Transcriptase Reversa análogo de Nucleosídeo
ITRNN	Inibidores da Transcriptase Reversa Não-análogo de Nucleosídeo
LC- MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas <i>in tandem</i>
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LSQ	Limite Superior de Quantificação
LOP	Lopinavir
m/z	Razão massa/carga

MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
NUDFAC	Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosméticos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCDT	Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas
PI	Padrão Interno
PVHA	Pessoas Vivendo com HIV/AIDS
RAL	Raltegravir
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
REC	Recuperação
RF	Radiofrequência
RNA	Ácido Ribonucleico
RTV	Ritonavir
AIDS	<i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TARV	Terapia antirretroviral
TDF	Tenofovir
TV	Transmissão Vertical
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
3TC	Lamivudina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
2.1	Objetivo Geral .....	18
2.2	Objetivos Específicos .....	18
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
3.1	Epidemiologia da infecção pelo Vírus Da Imunodeficiência Humana e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida .....	19
3.2	Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) .....	21
3.3	Terapia antirretroviral .....	26
3.3.1	INIBIDORES DE TRANSCRIPTASE REVERSA ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDEO .....	27
3.3.2	INIBIDORES DE TRANSCRIPTASE REVERSA NÃO-ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDEO .....	28
3.3.3	INIBIDORES DE PROTEASE .....	28
3.3.4	INIBIDORES DE INTEGRASE .....	30
3.3.5	INIBIDORES DE FUSÃO .....	30
3.3.6	INIBIDORES DO RECEPTOR CCR5 .....	31
3.4	Efavirenz .....	31
3.4.1	FARMACOCINÉTICA .....	33
3.5	Terapia antirretroviral em gestantes .....	34
3.6	Farmacocinética populacional .....	36
3.7	Monitorização Terapêutica de Fármacos .....	37
3.7.1	MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE ANTIRRETROVIRAIS .....	38
3.7.2	MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE ANTIRRETROVIRAIS EM GESTANTES .....	40
3.8	<i>Dried Blood Spot</i> .....	41

3.9	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de massas <i>in tandem</i> (LC-MS/MS) .....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>45</b>
4.1	Substâncias e reagentes químicos .....	45
4.2	Preparo das soluções estoque e de trabalho .....	45
4.3	Preparo dos padrões de calibração e amostras de controle de qualidade em matriz ..	45
4.4	Procedimento de extração dos analitos .....	46
4.5	Análise em LC–MS/MS .....	47
4.6	Validação do método bioanalítico .....	49
4.6.1	SELETIVIDADE, EFEITO RESIDUAL E DETECÇÃO CRUZADA .....	49
4.6.2	LINEARIDADE, PRECISÃO E PRECISÃO .....	49
4.6.3	EFEITO MATRIZ, RECUPERAÇÃO E EFICIÊNCIA DO PROCESSO .....	50
4.6.4	ESTABILIDADE .....	51
4.6.5	EFEITO DO HEMATÓCRITO .....	51
4.6.6	EFEITO DE VOLUME .....	52
4.7	Coleta de amostras biológicas .....	52
4.8	Validação clínica .....	53
4.9	Modelagem Farmacocinética Populacional .....	53
4.9.1	DETERMINAÇÃO DO MODELO DE BASE ESTRUTURAL .....	54
4.9.2	DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE COVARIÁVEL .....	54
4.9.3	AVALIAÇÃO DO MODELO .....	54
4.10	Monitorização Terapêutica .....	55
4.11	Considerações éticas .....	55
4.11.1	SELEÇÃO DAS PARTICIPANTES .....	55
4.11.2	RISCOS E BENEFÍCIOS .....	55
4.11.3	RESOLUÇÃO Nº 466/12 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE/MS .....	56
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>

5.1	Desenvolvimento do método .....	57
5.2	Procedimento de extração dos analitos.....	60
5.3	Validação do método bioanalítico .....	61
5.3.1	SELETIVIDADE.....	61
5.3.2	EFEITO RESIDUAL E DETECÇÃO CRUZADA.....	62
5.3.3	LINEARIDADE E CURVA DE CALIBRAÇÃO .....	62
5.3.4	PRECISÃO E EXATIDÃO .....	67
5.3.5	EFEITO MATRIZ, RECUPERAÇÃO E EFICIÊNCIA DO PROCESSO .....	70
5.3.6	ESTABILIDADE .....	73
5.3.7	PARAMETROS ESPECÍFICOS DE VALIDAÇÃO APLICADOS A DBS .....	77
5.4	Validação clínica .....	78
5.5	Modelagem Farmacocinética Populacional e Monitorização Terapêutica.....	81
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>
	<b>APÊNDICE A - FORMULÁRIO DE RECRUTAMENTO .....</b>	<b>97</b>
	<b>APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE.....</b>	<b>100</b>
	<b>ANEXO A – CARTA DE ANUÊNCIA.....</b>	<b>102</b>
	<b>ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DE USO DE DADOS .....</b>	<b>103</b>
	<b>ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....</b>	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020, havia 1,3 milhão (970.000 – 1.6 milhão) de gestantes vivendo com HIV, das quais aproximadamente 85% [63 – >98%] receberam medicamentos antirretrovirais para prevenir a transmissão vertical (OMS, 2021). Como consequência, o número de crianças menores de 5 anos que foram contaminados com o HIV por suas mães reduziu 52% de 2010 para 2020 (UNICEF, 2021).

A terapia antirretroviral (TARV) de gestantes vivendo com HIV além de prevenir a progressão da doença também reduz o risco de transmissão do vírus para a criança através da placenta, amamentação ou durante o parto (ROUSTIT et al., 2008; CHILAKA; KONJE, 2021). O acesso a estratégias terapêuticas e novos medicamentos antirretrovirais permitiu o aumento da expectativa e qualidade de vida dos pacientes infectados pelo HIV, incluindo as gestantes.

A combinação de fármacos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRNs) e não análogos de nucleosídeos (ITRNNs), inibidores de protease (IPs) ou mesmo inibidores de integrase (INIs) é comumente usada em mulheres grávidas (ROUSTIT et al., 2008). No Brasil, o regime preferencial para gestantes em início de tratamento é baseado em uma dupla de ITRNs, sendo eles TDF/3TC (tenofovir disoproxil fumarato/lamivudina), juntamente com um INI, o raltegravir (RAL). Alternativamente, a TARV inicial pode incluir regimes de IP ou ITRNNs, contendo atazanavir/ritonavir (ATV/RTV) ou efavirenz (EFZ), respectivamente (BRASIL, 2019).

As alterações fisiológicas associadas à gravidez têm um grande impacto na farmacocinética dos antirretrovirais, sendo altamente variável especialmente durante o terceiro trimestre, devido ao aumento da depuração e metabolismo induzido desses fármacos pelas isoenzimas do citocromo P450, o que pode levar a concentrações plasmáticas subterapêuticas (ROUSTIT et al., 2008; JOHNSON-DAVIS; DOYLE, 2019). Portanto, as alterações relacionadas à farmacocinética dos medicamentos antirretrovirais devem ser cuidadosamente investigadas para otimizar a eficácia da TARV e garantir a segurança da paciente (MIROCHNICK; CAPPARELLI, 2004; BARONCELLI et al., 2008; PARIENTE et al., 2016).

O uso da monitorização terapêutica de fármacos (MTF) nessas pacientes está mostrando-se útil para o estabelecimento de tendências farmacocinéticas da TARV durante toda a gestação e assim orientar a necessidade ou não de ajuste da dose. No entanto, ainda não

há um consenso sobre o papel exato da MTF na rotina (MATSUI, 2012; JOHNSON-DAVIS; DOYLE, 2019).

Rotineiramente, as concentrações de fármacos para fins de MTF ou estudos farmacocinéticos são medidas em plasma que é obtido por punção venosa. Contudo, a amostragem de sangue para MTF em cartões de coleta de amostra, *Dried Blood Spot* (DBS), apresenta vantagens quando comparada à coleta de sangue venoso. Em princípio, qualquer analito que pode ser mensurado a partir de sangue total, soro, ou plasma pode igualmente ser medido a partir de sangue seco em papel (LAKSHMY, 2008; HEINE, 2008; FILALI-ANSARY et al., 2016).

Devido à pequena quantidade de amostra disponível para teste usando DBS, geralmente na faixa de 5 a 50 $\mu$ L, faz-se necessário o uso de instrumentação analítica baseada em espectrometria de massas, acoplada a cromatografia gasosa (CG-MS) ou a cromatografia líquida (LC-MS/MS), a qual une elevada sensibilidade e seletividade requerida para fins de MTF, em particular para as pequenas amostras provenientes de DBS (ANTUNES; CHARÃO; LINDEN, 2016; ZAKARIA et al., 2016).

Considerando sua potencial relevância clínica e a falta de um método bioanalítico validado para a determinação de antirretrovirais em amostras de DBS provenientes de gestantes, o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método para determinação da concentração de EFV, RAL, ATV e RTV em amostras de DBS e plasma usando LC-MS/MS, e determinar o perfil farmacocinético do EFZ em gestantes, assim como conduzir um estudo de MTF nestas pacientes. Este método poderá contribuir ainda para os interessados em investigar mais sobre a farmacocinética ou monitorar as concentrações terapêuticas desses antirretrovirais, principalmente em gestantes.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver um método para quantificação simultânea de quatro antirretrovirais em DBS e plasma usando LC-MS/MS, avaliar a farmacocinética e realizar monitorização terapêutica de efavirenz em gestantes em uso de terapia antirretroviral.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Desenvolver e validar um método bioanalítico para quantificação simultânea de EFZ, RAL, ATZ e RTV em amostras de DBS usando LC-MS/MS.

Executar os ensaios de validação dos parâmetros específicos à utilização de DBS como amostra biológica.

Adaptar e validar um método bioanalítico para quantificação simultânea de EFZ, RAL, ATZ e RTV em amostras de plasma humano usando LC-MS/MS.

Realizar a validação clínica para o EFZ em amostras em DBS provenientes de gestantes.

Propor um modelo farmacocinético populacional para o EFZ em gestantes.

Conduzir um estudo de monitorização terapêutica de EFZ em gestantes em uso de terapia antirretroviral.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Epidemiologia da infecção pelo Vírus Da Imunodeficiência Humana e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

A síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês, *Acquired Immuno-Deficiency Syndrome* (AIDS), foi descrita pela primeira vez como uma entidade clínica em 1981, nos Estados Unidos da América (EUA). Os relatos iniciais baseavam-se num aumento incomum da incidência do sarcoma de Kaposi e pneumonia por *Pneumocystis*, doenças que, na época, ocorriam raramente. Enquanto ambas as doenças são ocasionalmente observadas em diferentes populações (por exemplo, sarcoma de Kaposi em homens mais velhos da região do Mediterrâneo ou pneumonia por *Pneumocystis* em pacientes com leucemia após quimioterapia intensiva), a ocorrência destas doenças como indicadores de imunodeficiência grave não haviam sido observadas em indivíduos jovens saudáveis. Embora inicialmente admitiu-se a hipótese de que o estilo de vida e fatores comportamentais estavam causalmente relacionados, nos anos seguintes os avanços científicos permitiram a descoberta do agente etiológico da doença (HOFFMANN; ROCKSTROH, 2015).

No início de 1983, um novo retrovírus humano foi isolado no Instituto Pasteur, França, uma variante do retrovírus linfotrópico T (HTLV-I), a partir de uma cultura derivada de uma amostra de biópsia de linfonodo de paciente com linfadenopatia generalizada fornecida por médicos franceses (BARRÉ-SINOUSSE et al., 1983). As observações seguintes a este achado levaram à suposição de um vírus geneticamente mais distante do HTLV-I e HTLV-II. De fato, pouco tempo depois, o HTLV-III, mais tarde renomeado vírus da Imunodeficiência Humana tipo I (HIV-1), foi descoberto como o agente causador da AIDS (BARRÉ-SINOUSSE et al., 1983; POPOVIC et al., 1984; BARRÉ-SINOUSSE; ROSS; DELFRAISSY, 2013).

A AIDS compreende o estágio mais avançado da infecção pelo HIV. É definida pela ocorrência de mais de 20 infecções oportunistas ou cânceres relacionados ao HIV, podendo levar de 10 a 15 anos para que uma pessoa infectada pelo HIV desenvolva AIDS (OMS, 2017). De acordo com dados publicados pela OMS, havia aproximadamente 37,7 milhões de pessoas em todo o mundo vivendo com HIV/AIDS em 2020. Destes, 1,7 milhão eram crianças (<15 anos). Estima-se que 1,5 milhão de pessoas em todo o mundo se infectaram com o HIV em 2020, deste total 150.000 são crianças (<15 anos), a maioria infectada por suas mães soropositivas durante a gravidez, o parto ou a amamentação. Um quantitativo de 680 mil pessoas morreu de doenças relacionadas ao HIV em todo o mundo em 2020 (OMS, 2021).

No Brasil, em 2020, foram diagnosticados 32.701 novos casos de HIV e 29.917 casos de AIDS, com uma taxa de detecção de 14,1/100.000 habitantes, totalizando, no período de 1980 a junho de 2021, 1.045.355 casos de AIDS detectados no país. Desde o ano de 2012, observa-se uma diminuição na taxa de detecção de AIDS no Brasil, que passou de 22,0/100 mil habitantes (2012) para 14,1/100 mil habitantes em 2020, configurando um decréscimo de 35,7%; essa redução na taxa de detecção tem sido mais acentuada desde a recomendação do “tratamento para todos”, implementada nacionalmente em dezembro de 2013. Também em 2020, foi registrado um total de 10.417 óbitos por causa básica AIDS, com uma taxa de mortalidade padronizada de 4,0/100 mil habitantes, este indicador apresentou decréscimo de 30,6% na análise de dados disponíveis entre 2014 e 2020 (BRASIL, 2021).

Entre as gestantes, em um período de dez anos, houve um aumento de 30,3% na taxa de detecção de HIV: em 2010, registraram-se 2,1 casos/mil nascidos vivos e, em 2020, essa taxa passou para 2,7/mil nascidos vivos. Esse aumento pode ser explicado, em parte, pela ampliação do diagnóstico no pré-natal e a melhoria da vigilância na prevenção da transmissão vertical (TV) do HIV. A tendência de aumento também se verifica em todas as regiões do Brasil, sendo que as regiões Norte e Nordeste apresentaram os maiores incrementos dessa taxa nos últimos dez anos (111,3% e 73,8% respectivamente). Um total de 18,3% das gestantes infectadas foi registrado no Nordeste, estando Pernambuco e sua capital acima da média nacional para esse indicador (BRASIL, 2021).

Apesar do programa brasileiro de HIV ter alcançado altas taxas de detecção e tratamento, atingindo considerável progresso nos últimos dez anos, Mangal e colaboradores (2019) trazem uma discussão sobre uma segunda onda de infecções no Brasil. Segundo os autores, existem evidências emergentes que sugerem que as taxas de incidência de HIV no Brasil, particularmente entre os homens, podem estar aumentando. Tais avaliações foram feitas utilizando-se dados dos sistemas de saúde integrados do Brasil aplicados no desenvolvimento de um modelo matemático.

A epidemia do HIV afeta não apenas a saúde dos indivíduos, mas também afeta famílias, comunidades, o desenvolvimento e crescimento econômico das nações. Agravado a isso tem-se a constatação de que a grande maioria das pessoas vivendo com HIV está em países de baixa e média renda. Apesar dos avanços na compreensão científica do HIV, sua prevenção e tratamento, bem como anos de esforços significativos da comunidade global de saúde e organizações governamentais e da sociedade civil, muitas pessoas vivendo com HIV ou em risco de HIV ainda não têm acesso à prevenção, cuidados e tratamento, e ainda não há

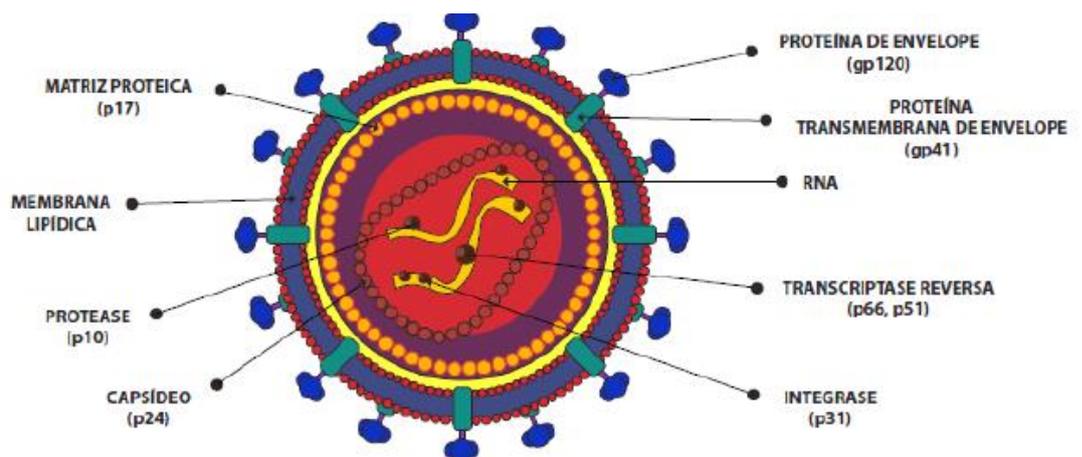
cura. Além disso, novas infecções entre adultos em todo o mundo não diminuíram suficientemente (UNAIDS, 2018).

### 3.2 Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

O HIV pertence ao gênero *Lentivirus* dentro da família *Retroviridae* e subfamília *Orthoretrovirinae*. Com base em características genéticas e diferenças nos antígenos virais, o HIV é classificado nos tipos 1 e 2 (HIV-1, HIV-2) (LUCIW, 1996). O HIV-1 é o microrganismo responsável pela AIDS humana (BARRÉ-SINOUSI et al., 1983). O HIV-2 é similar ao HIV-1 na medida em que ele também causa imunossupressão, porém é menos virulento, produz cargas virais mais baixas e demonstra uma progressão mais lenta para a AIDS (REEVES; DOMS, 2002; STEMPEL et al., 2019). O HIV-1 está distribuído por todo o mundo, enquanto o HIV-2 está confinado a partes da África (RANG et al., 2007).

O HIV consiste em uma partícula envelopada (bicamada lipídica) com glicoproteínas na superfície, abaixo desse envelope há uma primeira capa proteica, formada pela proteína de matriz, e que envolve um nucleocapsídeo cônico. O nucleocapsídeo contém o genoma viral, constituído por duas cópias de um RNA de cadeia simples de sentido positivo, além das enzimas transcriptase reversa - uma DNA polimerase RNA-dependente - e a integrase (Figura 1) (HUGO; RUSSELL, 1998).

**Figura 1** - Esquema ilustrativo da estrutura do HIV e seus principais constituintes.



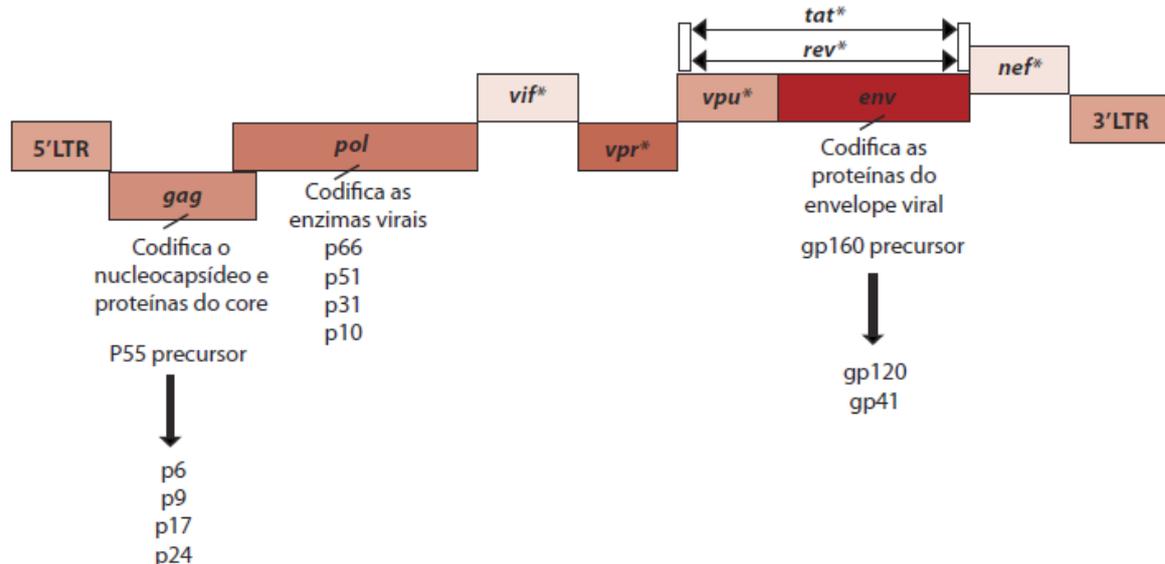
Fonte: BRASIL, 2018a.

O genoma do HIV consiste apenas nessas duas moléculas de RNA de cadeia simples que estão dentro do nucleocapsídeo do vírus. Já o genoma do provírus - nomenclatura dada ao estado latente onde o RNA retroviral é incorporado ao DNA da célula hospedeira, também

conhecido como DNA proviral - é gerado pela transcrição reversa do RNA viral em DNA de fita dupla, degradação do RNA e sua integração no genoma humano (LEVY, 2007).

O genoma viral constitui-se de um RNA mensageiro associado a um RNA transportador (RNAt), que funciona como iniciador (*primer*) para a reação de transcrição reversa, e codifica pelo menos três genes: *gag*, *pol* e *env*. Tais genes codificam as proteínas estruturais do capsídeo viral (*gag*), a transcriptase reversa/integrase (*pol*) e as glicoproteínas do envelope (*env*). Após sua internalização na célula hospedeira e perda do envelope, durante o processo de transcrição reversa, forma-se o genoma de DNA que é flanqueado em ambas as extremidades pelas sequências LTR (terminação repetitiva longa), conforme ilustrado na Figura 2. A região 5' LTR codifica o promotor para a transcrição dos genes virais. Na direção 5' a 3' tem-se o gene *gag*, codificando as proteínas estruturais do capsídeo (p24, p17, p6 e p9). O gene seguinte na sequência de leitura é o *pol*, responsável pela codificação para as enzimas protease (p11), transcriptase reversa (p51) e RNase H (p15) ou transcriptase reversa mais RNase H (juntos p66) e integrase (p31). Adjacente ao gene *pol*, segue-se a sequência de leitura do *env*, a partir do qual as duas glicoproteínas do envelope, gp120 (proteína de superfície) e gp41 (proteína transmembrana), são derivadas (LEVY, 2007; SAUTER et al., 2012).

**Figura 2** - Desenho esquemático da estrutura e organização do genoma do HIV-1.



LTR: terminação repetitiva longa; *gag*: grupo específico de antígenos; *pol*: polimerase; *env*: envelope.

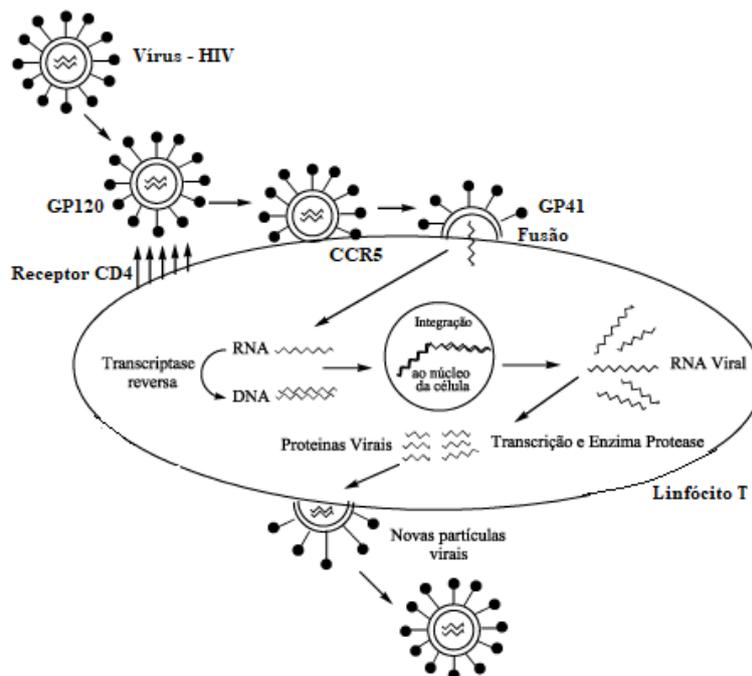
\*Genes acessórios.

Fonte: Adaptado de MILLER, 2010.

Além das proteínas estruturais, o genoma do HIV codifica várias proteínas reguladoras. *Tat* (proteína transativadora) e *rev* (proteína reguladora RNA-*splicing*) são necessárias para o início da replicação do HIV, enquanto as outras proteínas reguladoras *nef* (fator de regulação negativo), *vif* (fator de infectividade viral), *vpr* (proteína r viral) e *vpu* (proteína viral única) têm um impacto na replicação viral, brotamento do vírus e patogênese (LEVY, 2007; SAUTER, 2012).

O principal alvo do HIV são linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados. A entrada nessas células ocorre via interações com co-receptores CD4 e de quimiocinas, CCR5 ou CXCR4. Tal interação é mediada pela glicoproteína viral gp120 e a fusão do envelope viral com a membrana do hospedeiro, por sua vez, é mediada pela gp41 (RANG et al., 2007). A fusão leva à liberação do material genético e de enzimas necessárias para a replicação. Ocorre, então, a transcrição reversa do RNA genômico viral, caracterizado pela formação do DNA a partir do RNA pela ação da enzima transcriptase reversa do HIV, culminando na formação de uma dupla hélice de DNA viral. O DNA é transportado para dentro do núcleo celular, onde sofre clivagens específicas e é integrado ao DNA da célula do hospedeiro pela ação da enzima integrase. A ativação da célula hospedeira resulta na transcrição do DNA em RNA mensageiro, que é traduzido em proteínas virais (Figura 3) (TITONELI et al., 2019).

**Figura 3** - Ilustração do ciclo de replicação do HIV.



Fonte: Adaptado de SOUZA; ALMEIDA, 2003.

Outras células contendo receptores CD4 e de quimiocinas também são infectadas, incluindo células T CD4<sup>+</sup> não ativadas, monócitos, macrófagos e células dendríticas. A infecção por HIV independente de células T CD4<sup>+</sup> pode acontecer, especialmente em astrócitos (LIU et al., 2004) e células epiteliais renais (CHEN et al., 2011) e a subsequente expressão gênica do HIV tem um papel importante na patogênese do transtorno neurocognitivo associado ao HIV (relacionado aos astrócitos) e nefropatia (relacionada às células epiteliais) (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014).

Uma gama de proteínas da célula hospedeira entra em ação interagindo com proteínas do HIV ou do DNA do HIV para restringir ou promover replicação do vírus em tipos específicos de células (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014). Anticorpos são produzidos pelo hospedeiro contra vários componentes do HIV, porém é a ação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> que inicialmente impede a difusão do vírus. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> destroem diretamente as células infectadas, produzem e liberam citocinas antivirais. O evento letal desencadeado é a lise ou a indução de apoptose, através da interação do ligante *Fas* (“ligante da morte”), da célula infectada (RANG et al., 2007). Já os linfócitos T CD4<sup>+</sup> desempenham seu papel de células *helper* na ativação imunológica e podem elas mesmas apresentar papel direto no controle da replicação do HIV. Sua perda progressiva é característica definidora da infecção pelo HIV (NORRIS, 2004).

Do local original da infecção, o vírus é transportado para os linfonodos, onde se replica extensivamente em suas células hospedeiras-alvo, os linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Após a infecção, a maioria dos pacientes experimenta um breve quadro agudo semelhante à febre glandular que está associada a um declínio nas células T CD4<sup>+</sup> e altos títulos de vírus no sangue. Os níveis de vírus no sangue então declinam à medida que as respostas imunes celular e humoral são montadas. Um longo período de latência segue-se podendo durar de 1 a 15 anos ou mais antes de quaisquer outros sintomas clínicos tornarem-se aparentes. Os provírus integrados ao genoma do hospedeiro podem permanecer latentes indefinidamente. Durante esta longa fase assintomática, apenas uma pequena minoria de T CD4<sup>+</sup> produzem vírus e apenas títulos muito baixos de HIV podem ser detectados no sangue (HUGO; RUSSELL, 1998).

Com o passar do tempo, no entanto, há um declínio constante no número de células T CD4<sup>+</sup> no sangue e quando a contagem cai abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> o sistema imunológico torna-se severamente comprometido. O conseqüente aparecimento de outras infecções latentes causadas por organismos oportunistas tais citomegalovírus ou *Mycobacterium tuberculosis*, infecções secundárias decorrentes de uma variedade de patógenos oportunistas

como *Pneumocystis carinii*, aparecimento de doença neurológica, depressão da medula óssea, e cânceres levarão ao estabelecimento da AIDS no paciente e evolução ao óbito, que pode ocorrer em cerca de 2 anos em um paciente não tratado (HUGO; RUSSELL, 1998; RANG et al., 2007). A contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e carga viral (RNA do HIV) são os marcadores laboratoriais usados regularmente para gestão do paciente com HIV/AIDS, além de prever a progressão da doença e/ou resultados do tratamento (HOFFMANN et al., 2007).

O HIV é transmitido de pessoa para pessoa por secreções genitais, sangue (HUGO; RUSSELL, 1998) e verticalmente, da mãe infectada para o feto ao final do desenvolvimento, durante o parto, ou no aleitamento (GIBB; TESS, 1999). A prevenção da transmissão sexual do HIV tem sido uma prioridade desde o início da epidemia. Nenhuma intervenção relacionada a prevenção é eficaz o suficiente por si só, e muitas outras acabam sendo necessárias para controlar a epidemia. Durante vários anos, e apesar de estudos científicos limitados, para comprovar sua eficácia, o uso de preservativo em conjunto com mudanças educacionais e comportamentais eram a única forma de prevenção contra a infecção pelo HIV (BARRÉ-SINOUSSE; ROSS; DELFRAISSY, 2013; MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014).

Vários avanços importantes foram feitos na pesquisa sobre intervenção preventiva nos últimos anos, especialmente incluindo o uso de antirretrovirais. O primeiro marco em termos de prevenção biomédica foi a prova de que a terapia antirretroviral poderia ser eficaz na prevenção da transmissão materno-infantil do HIV durante a gravidez. Além disso, estudos revelam que a TARV é uma potente intervenção para reduzir a transmissão sexual do HIV, um desses exemplos é o estudo HPTN 052 de Cohen e colaboradores (2011) que revelou a diminuição da taxa de infecção pelo HIV em localidades com alta cobertura de acesso à TARV. Além disso, os antirretrovirais também têm sido utilizados como estratégia na profilaxia pré-exposição (BARRÉ-SINOUSSE; ROSS; DELFRAISSY, 2013; MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014).

No que diz respeito ao desenvolvimento de uma vacina contra o vírus, grandes desafios têm dificultado o progresso científico, incluindo a diversidade genética do HIV, incerteza sobre em que se constitui a imunidade protetora do hospedeiro e dificuldade no desenvolvimento de antígenos que não sejam altamente imunogênicos (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014). No entanto, em janeiro de 2022, a indústria farmacêutica Moderna, em parceria com a *International AIDS Vaccine Initiative* (IAVI), anunciou a realização de ensaios de fase 1 de uma vacina experimental contra o HIV, contendo RNA mensageiro, com 56 participantes, apesar do estudo ainda estar em andamento, há esperança de resultados promissores (IAVI, 2022).

No que tange ao tratamento da infecção pelo HIV, o uso dos medicamentos antirretrovirais (ARVs) em terapia combinada pode controlar o vírus para que as pessoas infectadas possam ter uma vida saudável. O acesso ao tratamento é fundamental para o esforço global de erradicação da AIDS, uma vez que as pessoas que vivem com o HIV e que estão conscientes do seu estado fazem uso da TARV diariamente obtêm e mantêm uma carga viral indetectável podendo assim ter uma vida longa e saudável. Além de garantir um grande benefício de prevenção da transmissão horizontal e vertical (UNAIDS, 2018).

### **3.3 Terapia antirretroviral**

A infecção pelo HIV tem uma patogênese complexa e varia substancialmente em diferentes pacientes. Tal especificidade de patogênese geralmente dificulta as opções de tratamento disponíveis para a infecção (BRASS et al., 2008). Além disso, como os vírus sequestram muitos dos processos metabólicos da própria célula do hospedeiro é difícil encontrar fármacos que sejam seletivos para o patógeno (RANG et al., 2007). O manejo efetivo da infecção pelo HIV tem obtido bons resultados através da utilização da combinação de diferentes fármacos disponíveis. Este método de tratamento é coletivamente conhecido como terapia antirretroviral (TARV). A TARV padrão é composta por uma associação de pelo menos três fármacos (OMS, 2018).

A TARV eficaz geralmente ajuda a controlar a multiplicação do HIV nos pacientes infectados e aumenta a contagem de células T CD4<sup>+</sup>, prolongando assim a fase assintomática da infecção, retardando a progressão da doença, e também ajuda na redução do risco de transmissão (BISHOP et al., 2016). No final de 2020, 84% das pessoas vivendo com HIV conheciam seu status soro positivo, 87% destas estavam usando TARV e 90% das pessoas em tratamento apresentaram supressão viral (UNAIDS, 2021).

Terapias compostas por ARVs combinados capazes de suprimir a replicação viral foram desenvolvidos no final dos anos 90 e transformaram o HIV de uma doença com um desfecho fatal para uma com manejo crônico. Existem mais de 25 medicamentos registrados junto ao FDA que bloqueiam a replicação do HIV em diversas etapas do seu ciclo de vida (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014).

Atualmente estão disponíveis para utilização na terapêutica, fármacos de 6 diferentes classes terapêuticas: inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeo (ITRNs), inibidores de transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeo (ITRNNs), inibidores de protease (IPs), inibidores de integrase (INI), inibidores de fusão e inibidores do receptor CCR5 (BÉTHUNE, 2010; BRODER, 2010). Os regimes terapêuticos recomendados são

menos tóxicos e mais eficazes, sendo compostos por dois ITRNs combinados com fármacos ITRNN ou IP ou ainda INI (MAARTENS; CELUM; LEWIN, 2014).

### 3.3.1 INIBIDORES DE TRANSCRIPTASE REVERSA ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDEO

Esta classe engloba um grande grupo de análogos de nucleosídeos que sofrem fosforilação intracelular por enzimas quinases da célula do hospedeiro para originar o derivado 5'-trifosfato. Esta fosforilação permite que esses agentes imitem os trifosfatos de desoxirribonucleosídeos, que são os substratos naturais das DNA polimerases, como é o caso da enzima transcriptase reversa do HIV. A porção fosforilada compete então com os substratos trifosfatados da célula do hospedeiro pela síntese do DNA proviral pela transcriptase reversa. Eventualmente, a incorporação da porção 5' trifosfato, proveniente do ITRN, na cadeia do DNA viral em crescimento resulta na terminação da cadeia (GOLAN et al., 2014).

O desafio no planejamento de ITRNs é fazer com que o fármaco tenha uma semelhança suficiente com um nucleosídeo natural para que possa ser ativado por enzimas celulares, porém nem tão semelhante a um nucleosídeo natural a ponto de inibir os processos celulares (GOLAN et al., 2014). Todos os ITRNs recorrem a variações dessas características para atingir seus respectivos graus de seletividade. A  $\alpha$ -DNA-polimerase dos mamíferos é relativamente resistente aos efeitos dessa classe de fármacos. Contudo,  $\gamma$ -DNA-polimerase na mitocôndria da célula do hospedeiro é bastante sensível ao composto, e isto pode ser a base de alguns efeitos adversos. A principal utilidade desses fármacos é o tratamento do HIV, porém vários deles também possuem atividade útil contra outros vírus (RANG et al., 2007).

Alguns exemplos importantes de fármacos dessa classe são: zidovudina, lamivudina, didanosina, estavudina, abacavir, tenofovir e emtricitabina (RANG et al., 2007; REUST, 2011). Esses agentes diferem nas vias de fosforilação utilizadas e nos seus efeitos adversos. Embora tenham sido inicialmente avaliados como monoterapia ou em combinações de 2 fármacos, os ITRN são mais importantes como componentes de esquemas eficazes de 3 a 4 fármacos (GILMAN; HARDMAN; LIMBIRD, 2005). O tenofovir é um ITRN comum em regimes de TARV iniciais e é habitualmente utilizado com lamivudina ou emtricitabina (REUST, 2011).

A acidose láctica e hepatomegalia grave com esteatose foram relatadas com o uso de ITRNs, isoladamente ou em combinação com outros antirretrovirais. O tratamento com os ITRNs deve ser suspenso no contexto de aumento rápido dos níveis das transaminases,

hepatomegalia progressiva ou acidose metabólica ou láctica de causa desconhecida (KATZUNG, 2003).

### 3.3.2 INIBIDORES DE TRANSCRIPTASE REVERSA NÃO-ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDEO

Os ITRNNs são compostos quimicamente diversos que se ligam à enzima transcriptase reversa próximo ao seu sítio catalítico e a desnaturam. Esses agentes compartilham não apenas um mecanismo de ação comum, mas também algumas toxicidades e perfis de resistência. Ao contrário dos ITRNs, os ITRNNs não sofrem fosforilação. A maioria dos fármacos dessa classe são indutores, substratos ou inibidores, em graus variados, das enzimas hepáticas do citocromo P450 e, portanto, estão sujeitos a interações farmacológicas (GILMAN; HARDMAN; LIMBIRD, 2005; RANG et al., 2007).

Os fármacos desta classe são: nevirapina, efavirenz e delavirdina. A nevirapina e efavirenz são os ITRNNs mais utilizados, no entanto a utilização de nevirapina é limitada pela sua associação com hepatotoxicidade grave e falência hepática (GIACOMELLI et al., 2018). Deste modo, o efavirenz acaba por ser o ITRNN mais utilizado (COSTA et al., 2015).

Os ITRNNs são biodisponíveis por via oral e, tipicamente, seus efeitos adversos (mais comumente exantema) são menos graves que aqueles da maioria dos ITRNs. No entanto, erupções graves, incluindo a síndrome de Stevens-Johnson, foram registradas em pacientes. A principal limitação para o uso de ITRNNs consiste no rápido desenvolvimento de resistência, exigindo o uso desses fármacos em associação com outros ARVs (KATZUNG, 2003; GOLAN et al., 2014).

### 3.3.3 INIBIDORES DE PROTEASE

As proteínas virais recém-formadas são produzidas na forma de precursores de poliproteínas, longas unidades compostas de enzimas virais e proteínas estruturais juntas. A ação proteolítica da protease é essencial para clivar o polipeptídeo precursor viral em enzimas virais ativas (transcriptase reversa, protease e integrase) e proteínas estruturais. Os IPs atuam através de sua ligação reversível no sítio ativo da enzima protease do HIV, sendo a atividade proteolítica descontinuada, bloqueando assim a maturação subsequente do vírus (SOUZA; ALMEIDA, 2003).

A protease do HIV-1 é um dímero, cada monômero contribui com um ácido aspártico para a formação do local catalítico. Em contraste, as aspartilproteases humanas, que seriam as

estruturas mais semelhantes às proteases virais, contêm apenas uma cadeia polipeptídica. Essas diferenças estruturais permitem que os IPs tenham uma afinidade 1000 vezes maior com a protease do HIV (GILMAN; HARDMAN; LIMBIRD, 2005).

Os IPs, quando utilizados em associação com outros agentes antirretrovirais, tiveram grande impacto na terapia da AIDS. Os IPs disponíveis são: amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir, lopinavir, saquinavir, tipranavir, darunavir e atazanavir, todos atuam através de sua ligação reversível com o sítio ativo da protease do HIV (KATZUNG, 2003; GILMAN; HARDMAN; LIMBIRD, 2005; HUGHES et al., 2011).

Tal como ocorre com todos os ARVs, a replicação do vírus na presença de IPs acaba levando a seleção de vírus resistentes a esses fármacos. Infelizmente, alterações genotípicas específicas que conferem a resistência fenotípica são bastante comuns com esses agentes, contraindicando a monoterapia. As concentrações subótimas de IPs predisõem ao desenvolvimento de resistência do vírus. A questão da resistência cruzada entre os agentes desta classe de medicamentos é complexa e requer investigação, uma vez que, embora cada fármaco determine a seleção de diferentes mutações do gene da protease, a resistência a um IP frequentemente prenuncia uma resposta clínica menos favorável a outros IPs subsequentemente prescritos, independentemente dos resultados do teste de resistência (KATZUNG, 2003; GILMAN; HARDMAN; LIMBIRD, 2005).

Síndrome de redistribuição e acúmulo de gordura corporal que inclui obesidade central, aumento da gordura dorsocervical, perda de peso periférica e facial, aumento mamário, e uma aparência *cushingoid* (condição patológica onde há excesso de cortisol) foi observada em pacientes que receberam TARV contendo IP. Apesar de controversas, essas anormalidades parecem estar particularmente associadas ao uso de IPs. Aumentos concomitantes nos níveis de triglicérides e LDL, juntamente com intolerância à glicose e resistência à insulina, também foram observadas, ainda sem causa conhecida. Os IPs também têm sido associados ao aumento do sangramento espontâneo em pacientes com hemofilia A ou B (KATZUNG, 2003; GOLAN et al., 2014).

Todos os IPs são substratos da isoenzima CYP3A4. Como tal, são potenciais para interações medicamentosas. Além disso, alguns dos IPs são inibidores da CYP3A4, tendo assim o potencial de causar diminuição da depuração e aumento da concentração de outros fármacos substratos dessa enzima. Por esta razão, os inibidores da CYP3A4 não devem ser administrados concomitantemente com agentes que são fortemente metabolizados pelo CYP3A4 (KATZUNG, 2003).

### 3.3.4 INIBIDORES DE INTEGRASE

A integrase do HIV 1 (IN) é uma proteína enzimática envolvida na catálise da reação de integração entre o DNA viral e o genoma do hospedeiro no núcleo da célula infectada (BUSHMAN; CRAIGIE, 1991). A integração do DNA do HIV-1 pela IN no genoma celular é um passo obrigatório no ciclo do retrovírus resultando em infecção permanente e estabelecimento de um reservatório para produção de vírus. A inibição da atividade da IN nesta fase pode parar a integração de material genético viral no genoma do hospedeiro. Devido à importância e natureza única da IN, ela constituiu-se como um ótimo alvo para o desenvolvimento de fármacos (PANDEY; GRANDGENETT, 2008; FAN et al., 2011).

Os INI são a classe de medicamentos mais recente aprovada com base em seus perfis de eficácia e segurança. Existem três fármacos desta classe clinicamente aprovados, raltegravir, elvitegravir e dolutegravir (SHARMA, 2015). Os INI agora fazem parte dos regimes de primeira linha preconizados nas diretrizes clínicas, inclusive no Brasil (BRASIL, 2019). Os INI são geralmente bem tolerados com poucas descontinuações devido a efeitos adversos. Uma das diferenças entre os três fármacos da classe é a inibição da secreção tubular renal de creatinina pelo dolutegravir, o que leva a um rápido aumento sustentado da creatinina sérica, embora a taxa de filtração glomerular não seja afetada (GUTIERREZ et al., 2014). Segundo Lepik e colaboradores (2018), os INI são geralmente bem tolerados quando prescritos na prática clínica de rotina, sendo importante considerar as diferenças potenciais nos perfis de efeitos colaterais desses fármacos a fim de embasar a individualização da terapia.

### 3.3.5 INIBIDORES DE FUSÃO

Esta classe age bloqueando a entrada do HIV nas células T CD4<sup>+</sup> de pacientes infectados, através da inibição da fusão de partículas do HIV com estas células (GREENBERG; CAMMACK, 2004). Há apenas um fármaco neste grupo: o enfurvirtide. O fármaco é geralmente administrado por injeção subcutânea em combinação com outros ARVs quando a resistência se torna um problema, ou quando o paciente não tolera os outros ARVs. Seus efeitos adversos incluem sintomas que se assemelham aos de uma gripe, efeitos centrais, efeitos gastrintestinais e, algumas vezes, reações de hipersensibilidade (RANG et al., 2007).

### 3.3.6 INIBIDORES DO RECEPTOR CCR5

Os inibidores do receptor de quimiocinas CCR5 são uma nova classe de medicamentos ARVs usados no tratamento do HIV. Eles foram planejados para prevenir a infecção de células T CD4<sup>+</sup> pelo HIV através do bloqueio do receptor CCR5. Quando o receptor CCR5 não está disponível, o HIV R5-*tropic* (a variante do vírus que é comum na infecção precoce pelo HIV) não consegue interagir com uma célula T CD4<sup>+</sup> para infectá-la (RAO, 2009).

No processo de infecção das células T CD4<sup>+</sup> pelo HIV, o vírus requer um receptor como porta de entrada para entrar nas células alvo. Ele deve se ligar à receptores na superfície das células ou abrir as “fechaduras” para entrar. A primeira “fechadura” é aberta pela ligação ao receptor da célula CD4 nos glóbulos brancos. Em seguida, ele precisa abrir uma segunda “fechadura” para abrir a “porta” de acesso para as células T CD4<sup>+</sup> e infectá-las; esta segunda “fechadura” ou receptor é chamado de CCR5. Algumas pessoas apresentam mutações no gene CCR5 que codifica para este receptor. Este gene mutado é chamado de delta 32 de CCR5, nesta mutação estão ausentes 32 pares de bases. A mutação altera a estrutura do receptor, portanto, o HIV não consegue abrir com eficiência a “fechadura” e entrar na célula. De posse dessas observações, os fármacos dessa classe exploraram tal possibilidade de bloqueio de entrada do vírus nas células alvo (KWONG et al., 2000; SILVA; STUMPF, 2004).

O maraviroque foi a primeira droga desta classe a ser comercializada foi registrado em 2007 e é o representante mais importante da classe (BHATTI; USMAN; KANDI, 2016).

Os antagonistas dos receptores de quimiocinas são os primeiros ARVs a se ligar a uma proteína celular do hospedeiro e, como tal, estimulam preocupações únicas de segurança. No que diz respeito ao desenvolvimento de resistência viral a esta classe, como o alvo do fármaco é uma proteína da célula hospedeira, ela não sofrerá mutação em resposta à terapia com o antagonista do CCR5. No entanto, a adaptação viral aos inibidores do CCR5 pode envolver alterações na proteína do envelope viral que alteram a dependência do CCR5. A maior preocupação teórica é a potencial seleção de vírus com tropismo para o receptor CXCR4 em resposta ao bloqueio do CCR5 (RAO, 2009).

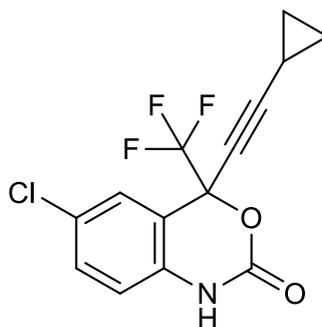
## 3.4 Efavirenz

Efavirenz (EFZ) é um ITRNN, aprovado inicialmente em 1998 pelo FDA para o tratamento da infecção pelo HIV-1, tornando-se rapidamente um componente importante da TARV em vários países (VROUENRAETS et al., 2007). No Brasil, era o medicamento mais custo-efetivo para o tratamento da AIDS, consumido por 40% dos portadores do vírus, o que,

dentre outros fatores, embasou o decreto do governo brasileiro, em 2007, pelo licenciamento compulsório do EFZ para uso público não-comercial (RODRIGUES; SOLER, 2009).

O EFZ é quimicamente descrito como (S)-6-cloro-4-(ciclopropiletinil)-1,4-di-hidro-4 (trifluorometil)-2H-3,1-benzoxazin-2-ona. Sua fórmula química é  $C_{14}H_9ClF_3NO_2$ . Possui uma massa molecular de 315,03 g/mol e é praticamente insolúvel em água ( $< 10 \mu\text{g/mL}$ ) (VROUENRAETS et al., 2007). A estrutura do EFZ é mostrada na Figura 4. Assim como os demais ITRNN, o EFZ interfere especificamente com a função da transcriptase reversa do HIV-1 ao ligar-se a uma bolsa hidrofóbica específica dentro da enzima e não apresenta qualquer efeito inibitório sobre a transcriptase reversa do HIV-2 ou sobre as DNA polimerases  $-\alpha$ ,  $-\beta$ ,  $-\gamma$  e  $-\delta$  das células humanas, atuando assim na inibição do processo de polimerização do DNA dependente de RNA (SPENCE et al., 1995).

**Figura 4** - Estrutura química do efavirenz (315,03 g/mol).



Fonte: Acervo próprio (Software ChemDraw).

O EFZ foi componente da TARV de primeira linha para adultos durante bastante tempo, sendo atualmente substituído por novos fármacos como os INI. No entanto, o EFZ ainda é bem utilizado no tratamento de adultos, especialmente em função da sua facilidade posológica (uma vez ao dia) (VROUENRAETS et al., 2007). Dentro desse grupo costumava-se contraindicar o uso de EFZ em gestantes e mulheres com alta probabilidade de engravidar (YENI; HAMMER; HIRSCH, 2004), em decorrência de estudos com primatas e alguns relatos de casos humanos que levantaram uma associação da exposição ao EFZ no primeiro trimestre com anomalias congênitas do sistema nervoso central (FUNDARO et al., 2002; DE SANTIS et al., 2002).

Tais achados divergiram de resultados clínicos em mulheres grávidas expostas a medicamentos ARVs durante o primeiro trimestre de gravidez. Revisões sistemáticas publicadas posteriormente não encontraram evidências de aumento do risco de doenças de anomalias congênitas associadas à exposição ao EFZ no primeiro trimestre (FORD et al.,

2014). Com base nessas evidências, em meados de 2012, a OMS divulgou uma atualização técnica que destacou os benefícios clínicos do uso de EFZ na gravidez e os potenciais riscos, e recomendou que o EFZ pode ser incluído como parte da terapia em mulheres grávidas e mulheres em idade fértil pois os benefícios superaram os riscos potenciais.

### 3.4.1 FARMACOCINÉTICA

No Brasil, o EFZ está disponível, isoladamente, em formas farmacêuticas líquidas (solução oral 30 mg/mL) e sólidas para administração oral (cápsula gelatinosa dura 200mg e comprimido revestido 600mg). Encontra-se disponível ainda a associação de dose fixa combinada de TDF 300mg + 3TC 300mg + EFZ 600mg em comprimido revestido de posologia diária única (BRASIL, 2022). A dose recomendada de EFZ é de 600 mg por via oral, uma vez ao dia, tomada em jejum, e de preferência na hora de dormir, a fim de diminuir possíveis efeitos colaterais neuropsiquiátricos (VROUENRAETS et al., 2007).

A biodisponibilidade oral do EFZ é de 40 - 45% (FRIEDLAND et al., 2006; FABBIANI et al., 2009) e uma variabilidade inter e intrarindividual de 54,6% e 26%, respectivamente (CSAJKA et al., 2003). O tempo para atingir as concentrações plasmáticas máximas ( $C_{max}$ ) é de aproximadamente 3 - 5 h e as concentrações plasmáticas em estado de equilíbrio são atingidas entre 6 - 10 dias. Em pacientes recebendo 600 mg de EFZ, a  $C_{max}$  em estado de equilíbrio foi de  $12,9 \pm 3,7 \mu\text{M}$  (equivalente a  $4,07 \pm 1,17 \mu\text{g/mL}$ ), a  $C_{min}$  em estado de equilíbrio foi de  $5,6 \pm 3,2 \mu\text{M}$  e a área sob a curva (ASC) foi  $184 \pm 73 \mu\text{M/h}$ . A faixa terapêutica proposta para este fármaco em indivíduos portadores do HIV é de 1 - 4  $\mu\text{g/mL}$  (MARZOLINI et al., 2001). A ingestão de alimentos junto com a administração do EFZ resulta em aumento da sua  $C_{max}$  e da ASC em comparação com a administração em jejum. O EFZ atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, com concentrações no líquido cefalorraquidiano variando de 0,26 a 1,19% da concentração plasmática (DONG, 1998; PORCHE, 2000; VROUENRAETS et al., 2007). O EFZ apresenta alta taxa de ligação proteica (99,5 a 99,75%), predominantemente à albumina. O volume de distribuição aparente descrito é de 252 L (200 a 326 L) (CSAJKA et al., 2003).

A farmacocinética do EFZ é caracterizada por uma elevada meia-vida plasmática, entre 52 a 76 horas após administração de dose única e de 40 a 55 horas após administração de doses múltiplas (TSUCHIVA et al., 2004). A principal via de metabolismo do EFZ é a formação do 8-hidroxi-EFZ, formado predominantemente pela CYP2B6. As isoformas CYP3A4, CYP3A5, CYP1A2 e CYP2A6 parecem ter menor contribuição nesta etapa

metabólica. A CYP2B6 também é a principal enzima envolvida na formação do metabólito secundário 8,14-dihidroxi-EFZ. Além disso, o EFZ pode ser hidroxilado a 7-hidroxi-EFZ pelo CYP2A6, uma via de menor relevância do metabolismo, correspondente a cerca de 23% do metabolismo geral do EFZ *in vitro* (WARD et al., 2003; DESTA et al., 2007; OGBURN et al., 2010). Portanto, existem três metabólitos hidroxilados do EFZ: 8-hidroxi-EFZ, 8,14-dihidroxi-EFZ e 7-hidroxi-EFZ (MCDONAGH et al., 2015).

A forma predominante de excreção do EFZ é como conjugado com glicuronídeo na urina, sendo o 8-hidroxiEFZ-glicuronídeo o principal metabólito encontrado (MCDONAGH et al., 2015). A eliminação do EFZ é caracterizada pela elevada meia vida e possui uma depuração, após administração oral, de 9,4 L/h (8,7 a 10,3 L/h) (CSAJKA et al., 2003). Os estudos realizados não demonstraram efeito de primeira passagem significativo (GAO et al., 2007).

### **3.5 Terapia antirretroviral em gestantes**

A TARV em gestantes vivendo com HIV além de prevenir a progressão da doença também reduz o risco de transmissão do vírus para a criança através da placenta, amamentação ou durante o parto (ROUSTIT et al., 2008; CHILAKA; KONJE, 2021). O uso de TARV durante a gravidez reduz a taxa de TV do HIV de aproximadamente 30% para menos de 1%, quando se alcança a supressão da carga viral materna (CV-HIV plasmática <50 cópias/mL) próxima ao parto (TOWNSEND et al., 2008; TUBIANA et al., 2010). Dessa forma, aliado a ações de prevenção e conscientização, a TARV universal é um elemento importante da profilaxia da TV do HIV (BRASIL, 2019). De acordo com a OMS, em 2020, havia 1,3 milhão (970.000 – 1.6 milhão) de gestantes vivendo com HIV, das quais aproximadamente 85% [63 – >98%] receberam medicamentos ARVs para prevenir a TV (OMS, 2021). Como consequência, o número de crianças menores de 5 anos que foram contaminados com o HIV por suas mães reduziu 52% de 2010 para 2020 (UNICEF, 2021).

No Brasil, segundo as orientações constantes no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos (2018b) e no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Prevenção da Transmissão Vertical de HIV, Sífilis e Hepatites Virais (2019), o início imediato da TARV está recomendado para todas as pessoas infectadas, independentemente do seu estágio clínico e/ou imunológico, especialmente em gestantes. Ou seja, a TARV poderá ser iniciada na gestante antes mesmo da disponibilidade dos resultados dos exames de contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CV-HIV e genotipagem, principalmente nos

casos de gestantes que iniciam tardiamente o acompanhamento pré-natal, com o objetivo de alcançar a supressão viral o mais rápido possível (BRASIL, 2019).

A combinação de ITRNs e ITRNNs, IPs ou mesmo INIs é comumente usada em mulheres grávidas (ROUSTIT et al., 2008). No Brasil, o regime preferencial para gestantes em início de tratamento é baseado em uma dupla de ITRNs, sendo eles TDF/3TC (tenofovir disoproxil fumarato/lamivudina), juntamente com um INI, o raltegravir (RAL). Alternativamente, a TARV inicial pode incluir regimes de IP ou ITRNNs, contendo atazanavir/ritonavir (ATZ/RTV) ou efavirenz (EFZ), respectivamente (BRASIL, 2019). O quadro a seguir traz, de forma simplificada, os esquemas preferencial e alternativos de TARV preconizados segundo as diretrizes clínicas brasileiras para gestantes vivendo com HIV/AIDS.

**Quadro 1** - Esquemas preferencial e alternativos preconizados em gestantes vivendo com HIV.

ESQUEMA PREFERENCIAL	ARVs ALTERNATIVOS
TDF + 3TC + RAL (300 mg/300 mg)** 1x/dia + 400 mg 2x/dia	Contraindicação ao TDF: AZT
	Contraindicação ao TDF e AZT: ABC*
ESQUEMA ALTERNATIVO	OBSERVAÇÕES E ARVs ALTERNATIVOS
TDF + 3TC + EFZ (300 mg/300 mg/600 mg)** 1x/dia	Quando estiverem presentes aspectos de má adesão
	Para uso do EFZ, é mandatória a demonstração de sensibilidade na genotipagem pré-tratamento
	Contraindicação ao TDF: AZT
	Contraindicação ao TDF e AZT: ABC*
TDF + 3TC + ATZ/RTV (300 mg/300 mg)** 1x/dia + (300 mg/100 mg)** 1x/dia	Contraindicação ao ATZ/RTV: DRV/RTV
	Contraindicação ao TDF: AZT
	Contraindicação ao TDF e AZT: ABC*

ABC: abacavir; ATZ: atazanavir; AZT: zidovudina; DRV: darunavir; RAL: raltegravir; RTV: ritonavir; TDF: tenofovir disoproxil fumarato; 3TC: lamivudina.

\*Autorizado apenas se HLA-B\*5701 negativo.

\*\*Dose fixa combinada.

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2019.

Apesar da alta taxa de resposta de boa parte das pacientes à TARV, ela pode falhar por numerosas razões, incluindo fatores farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos relacionados à variabilidade interindividual, adesão incompleta, fisiologia gestacional e resistência aos fármacos (LIU; MA; ZHANG, 2010; D'AVOLIO et al., 2014). Devido às alterações fisiológicas específicas em mulheres grávidas, o acompanhamento farmacoterapêutico através da monitorização terapêutica pode ser considerado para garantir

concentrações plasmáticas adequadas dos fármacos e níveis indetectáveis de RNA do HIV, garantindo assim a prevenção da TV e o tratamento adequado da gestante (BUCKOREELALL; CRESSEY; KING, 2012).

### **3.6 Farmacocinética populacional**

As concentrações de fármacos podem variar significativamente entre os indivíduos que seguem o mesmo regime de dosagem. Tal variabilidade pode ser atribuída a fatores intrínsecos ao paciente, como a presença e extensão de insuficiência hepática ou renal ou a presença de polimorfismos genéticos, ou a fatores extrínsecos do paciente, como consumo de alimentos ou medicamentos que podem interagir com o medicamento administrado. Em alguns casos, os fatores intrínsecos e/ou extrínsecos levam a alterações farmacocinéticas clinicamente relevantes que requerem estratégias de manejo clínico, como alteração na dose ou regime de dosagem (FDA, 2019).

O conceito de farmacocinética populacional (popPK) converge para uma abordagem que procura avaliar a extensão da variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos em uma população de pacientes e identificar quais fatores são responsáveis pela mesma, correlacionando-os entre si (BUCLIN; NICOD; KELLENBERGER, 2009; MOULD; UPTON, 2012; CHARLES, 2014). Na atualidade, a modelagem popPK é considerada uma importante metodologia fármaco-estatística, sendo aplicada no estudo da disposição dos fármacos em diferentes condições clínicas (BUCLIN; NICOD; KELLENBERGER, 2009).

A análise de popPK normalmente inclui dados coletados diretamente de pacientes, permitindo uma avaliação integrada de vários fatores intrínsecos e extrínsecos. Além disso, o número relativamente grande de pacientes incluídos na análise popPK pode melhorar a precisão do efeito estimado dos fatores que afetam a exposição ao medicamento e confirmar ainda quais fatores não alteram as exposições aos medicamentos. Essas informações podem vir de estudos com amostragem farmacocinética rica ou amostragem farmacocinética esparsa, após uma dose única ou em estado de equilíbrio, e de indivíduos saudáveis ou da população de pacientes. Essas análises, por sua vez, podem informar estratégias para gerenciar a dosagem e administração para uma determinada subpopulação e planejar estudos subsequentes para um medicamento já disponível ou para conduzir estudos para a administração de novos fármacos (FDA, 2019).

Os modelos farmacocinéticos baseiam-se na descrição sobre os processos ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) na fisiologia e anatomia dos indivíduos e a bioquímica dos compostos. Um modelo farmacocinético subdivide o corpo em

compartimentos que representam órgãos conectados por meio de um fluido, geralmente sangue, e mapeia os movimentos do fármaco no corpo utilizando conjuntos de equações diferenciais (BOIS; BROCHOT, 2016; JAMEI, 2016). Os parâmetros do modelo correspondem a entidades fisiológicas e bioquímicas específicas do corpo e do(s) composto(s) em estudo, como volumes de órgãos, fluxos sanguíneos teciduais, afinidades do composto com os tecidos, ou a depuração metabólica (BOIS; BROCHOT, 2016).

Parâmetros farmacocinéticos derivados da população, como a depuração, poderiam então ser usados para orientar a prescrição para pacientes individuais. Essa individualização da terapia a partir de dados populacionais exigiu a identificação e quantificação de várias fontes de variabilidade farmacocinética, como peso, idade, estado gestacional, função renal e interações medicamentosas significativas. Os estudos farmacocinéticos tradicionais geralmente envolvem várias amostras coletadas em intervalos fixos de voluntários saudáveis. Em contraste, os dados farmacocinéticos da população são obtidos de pacientes em tratamento com um medicamento. Esses pacientes geralmente tomam doses diferentes e coletam amostras de sangue em momentos diferentes. A abordagem popPK permitiu discussões mais amplas sobre a monitorização terapêutica de fármacos (MTF) de rotina a partir do conhecimento de que uma farmacoterapia otimizada poderia ser alcançada pela análise de dados de concentração-tempo de fármacos (CHARLES, 2014).

### **3.7 Monitorização Terapêutica de Fármacos**

A monitorização terapêutica de fármacos (MTF) é definida como a análise de concentrações *in vivo* do fármaco e ajuste do seu regime de dosagem com base nas concentrações medidas (BACK et al., 2002). Sendo assim, a MTF refere-se à individualização da dosagem do fármaco, mantendo as concentrações plasmáticas ou sanguíneas do fármaco dentro de um intervalo terapêutico. Associada aos conhecimentos de parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, a MTF permite a avaliação da eficácia e segurança de um determinado medicamento em uma variedade de contextos clínicos (KANG; LEE, 2009). A maioria dos medicamentos não necessita da utilização da MTF para avaliar sua eficácia, esta é avaliada de forma satisfatória através dos resultados clínicos. No entanto, certos agentes beneficiam-se da monitorização de suas concentrações para assegurar segurança e eficácia aceitáveis (GIBBON, 2005).

Várias características são necessárias para que um fármaco seja considerado um candidato apropriado para prática de MTF. Um requisito essencial é a presença de uma relação dose-resposta (ou seja, as concentrações plasmáticas devem correlacionar-se com a

eficácia do fármaco ou toxicidade). É necessário ainda existir uma faixa terapêutica definida disponível. Outro requisito é a existência de variabilidade interindividual significativa e baixa variabilidade intrapaciente das concentrações plasmáticas. É de suma importância ainda a disponibilidade de um ensaio confiável com sensibilidade aceitável e alta seletividade para determinação das concentrações do fármaco (RAYNER; DOOLEY; NATION, 2006; KREDO et al., 2009), além disso, esse método deve fornecer uma resposta em intervalo de tempo curto o suficiente para permitir uma tomada de decisão oportuna (GHICULESCU, 2008).

Idealmente, a MTF permite a individualização do tratamento através da orientação do ajuste do regime de dosagem. Não obstante, a quantificação da concentração do fármaco também pode desempenhar um papel na avaliação da adesão ao tratamento quando há falha para alcançar o objetivo terapêutico (MATSUI, 2012).

### 3.7.1 MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE ANTIRRETROVIRAIS

O esquema de TARV permite algumas variações de composição e pode ser alterado de acordo com a resposta do paciente, toxicidade e desenvolvimento de resistência. Os ARVs são tipicamente administrados em doses fixas padrão, sem ajuste de dose em decorrência de características individuais que poderiam afetar as concentrações do fármaco, como sexo, dieta, polimorfismos genéticos ou farmacocinética alterada (KREDO et al., 2009).

A MTF de ARVs visa melhorar a eficácia e segurança da TARV, mantendo concentrações plasmáticas dos fármacos nos pacientes dentro do intervalo terapêutico. Muitos artigos de revisão sugerem que a MTF de ARVs pode ser uma ferramenta útil para melhorar os resultados para indivíduos infectados pelo HIV (BACK et al., 2002; MOLTO; CLOTET, 2004; BOFFITO et al., 2005; KREDO et al., 2009; PUNYAWUDHO et al., 2016). Tais estudos sugerem que a MTF de ARVs pode identificar potencialmente pacientes em subterapia e com concentrações de fármacos acima da faixa terapêutica, gerando toxicidade. A MTF de ARVs é, portanto, uma ferramenta potencialmente racional para otimizar a eficácia e minimizar a toxicidade da TARV (KREDO et al., 2009).

Vários ARV, especialmente, os IPs e os ITRNNs partilham a maior parte dos critérios para aplicação da MTF. Uma relação clara entre as concentrações de fármaco e a eficácia dos IPs e dos NNRTIs já é documentada na literatura (DURANT et al., 2000; VRIES-SLUIJS et al., 2003; DAHRI; ENSOM, 2007) enquanto que para as concentrações plasmáticas de ITRNs nem sempre as mesmas correlações podem ser feitas devido ao metabolismo intracelular para geração dos metabólitos ativos (BAZZOLI et al., 2010). A maioria dos ARV exibem grande

variabilidade interindividual que é em parte devido à variabilidade das características do paciente, atividade diferenciada de enzimas metabolizadoras, polimorfismos genéticos e potencial para interações medicamentosas e alimentares (MOLTO et al., 2006; CATTANEO et al., 2014).

Para avaliação clínica dos resultados da TARV, a carga viral e contagem de células T CD4<sup>+</sup> são os principais parâmetros. Entretanto, entre pacientes infectados com cepas resistentes e tratados com regimes de ARV que não foram inicialmente selecionados a partir do perfil de teste de resistência, a avaliação desses parâmetros pode não ser suficiente para a prevenção da resistência, uma vez que a resistência pode ter se desenvolvido antes de um aumento observado de replicação viral. Portanto, a realização de MTF e otimização das concentrações dos fármacos logo após o início do tratamento, juntamente com a seleção da TARV a partir de resultados de testes de resistência é altamente recomendada para prevenir ou retardar o desenvolvimento de resistência (PUNYAWUDHO et al., 2016).

Embora vários medicamentos ARV atendam a maioria dos critérios que embasam a aplicação de MTF, existem fatores que limitam o uso rotineiro (não direcionado) de MTF para todos os pacientes na prática clínica. O argumento mais importante contra seu uso rotineiro é que muitos pacientes experimentam bons resultados com a TARV preconizada atualmente devido ao melhor perfil farmacocinético e relação segurança/benefício. Como consequência, a aplicação “às cegas” de MTF em pacientes bem tratados pode oferecer benefício apenas para uma minoria de pacientes, e não é provável que seja custo-efetivo (PUNYAWUDHO et al., 2016).

Sendo assim, embora a MTF não seja recomendada rotineiramente, ela pode ser útil em algumas situações, incluindo:

- Suspeitas de interações fármaco- fármaco ou fármaco -alimento, resultando em alterações de eficácia ou toxicidade;
- Alterações fisiopatológicas que podem alterar a farmacocinética, isto é, disfunção hepática ou renal;
- Populações especiais, incluindo crianças e mulheres grávidas;
- Pacientes não-iniciantes de tratamento que podem ter cepas virais com reduzida suscetibilidade;
- Toxicidades dependentes da concentração;
- Resposta virológica subótima em pacientes com boa adesão (VAN LUIN; KUKS; BURGER, 2008).

### 3.7.2 MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE ANTIRRETROVIRAIS EM GESTANTES

Alterações fisiológicas que ocorrem durante a gravidez podem impactar na farmacocinética dos fármacos. Devido a tais alterações, a MTF pode ser considerada para garantir concentrações plasmáticas adequadas dos ARVs e manutenção de níveis indetectáveis de RNA do HIV, um pilar para a prevenção da TV (MATSUI, 2012; PUNYAWUDHO et al., 2016).

As alterações fisiológicas durante a gestação ocorrem a partir do primeiro trimestre e atingem um pico no terceiro trimestre (BUCKOREELALL; CRESSEY; KING, 2012). Níveis elevados de progesterona diminuem o esvaziamento gástrico e a motilidade intestinal. Náuseas e vômitos podem ocorrer durante o início da gravidez causando diminuição da absorção dos ARV após administração oral. Além disso, a diminuição da produção de ácido gástrico pode aumentar o pH no ambiente estomacal (FEGHALI; VENKATARAMANAN; CARITIS, 2015), o que pode diminuir a absorção de fármacos ácidos fracos, incluindo IPs e ITRNNs (BUCKOREELALL; CRESSEY; KING, 2012). O volume de distribuição pode sofrer alteração durante a gravidez devido à diminuição das proteínas plasmáticas, por exemplo, albumina e  $\alpha$ -glicoproteína ácida, e aumento do volume plasmático (COSTANTINE, 2014).

O metabolismo hepático de fármacos mediado pelas enzimas CYP3A4, 2A6, 2D6, 2C9 e uridina 5'-difosfato glucuronosiltransferases (UGT) pode ser intensificado. Por outro lado, as atividades de algumas isoformas do CYP, como CYP1A2 e CYP2C19, pode estar diminuída durante a gravidez. Alterações nas atividades das enzimas hepáticas podem impactar na eliminação de fármacos administrados por via oral, alterando assim a exposição de fármacos primariamente metabolizados por enzimas hepáticas, como é o caso de IPs e ITRNNs. A excreção renal também sofre alterações e encontra-se aumentada em gestantes como resultado do aumento fluxo sanguíneo e filtração glomerular, levando ao aumento da depuração de fármacos (MATSUI, 2012).

Devido a alterações na farmacocinética de ARV durante a gestação, a MTF em gestantes vivendo com HIV, juntamente com o acompanhamento de parâmetros farmacodinâmicos pode facilitar o ajuste de dose nesta população. Isto é especialmente importante no caso de mulheres que não atingem a supressão viral durante os primeiros estágios da gravidez, o que pode aumentar os riscos de supressão inadequada ou falha virológica no último trimestre (PUNYAWUDHO et al., 2016). Outro fator que pode contribuir para as concentrações plasmáticas subterapêuticas dos ARVs em gestantes é a não

adesão à farmacoterapia, o que também sugere uma potencial aplicação para a MTF. Em detrimento da relevância deste tema, até o momento, há escassez de estudos em larga escala envolvendo a MTF de antirretrovirais durante a gestação e sua correlação com o desfecho clínico.

### 3.8 *Dried Blood Spot*

Ensaio de MTF são geralmente realizados em soro ou plasma, obtidos por punção venosa. No entanto, há um crescente interesse em amostragem utilizando sangue gotejado em cartão de papel, *Dried Blood Spot* (DBS), para fins de MTF em comparação com a amostragem convencional de sangue venoso. A amostragem em DBS é um método conveniente e simples, com maior conforto para o paciente. O processo de coleta de amostra é realizado através da punção de uma área previamente desinfetada, habitualmente o dedo, com o auxílio de uma lanceta descartável (WILHELM et al., 2014).

Com instruções claras e após adequado treinamento, os pacientes podem ser capazes de realizar auto coleta em casa (*homesampling*). O sangue coletado é gotejado em um círculo pré-marcado em um cartão de coleta feito de papel de filtro, o DBS permanece em temperatura ambiente para secagem e, em seguida, é embalado para o transporte para o laboratório. No laboratório, um disco é retirado do DBS, cada disco representa um volume de sangue absorvido, dependendo do seu diâmetro. A amostra é então encaminhada para extração e quantificação utilizando técnica analítica adequada. Vários métodos foram publicados abordando a quantificação de fármacos em DBS para fármacos antiepilépticos, imunossupressores, antirretrovirais, terapia cardiovascular, fármacos psicoativos e antibióticos (EDELBOEK; VAN DER HEIJDEN; STOLK, 2009; WILHELM et al., 2014).

A amostragem em DBS tem várias vantagens em comparação com a amostragem venosa convencional, mas também apresenta desvantagens. As principais vantagens são: amostragem fácil e minimamente invasiva, possibilidade de *homesampling* pelo próprio paciente, apenas um pequeno volume é necessário e as coletas podem ser feitas com mais de uma réplica, a maioria dos analitos é mais estável no DBS do que em amostras congeladas e o armazenamento e transporte são mais convenientes. (D'ARIENZO et al., 2010; RAO et al., 2010; LI; ZHANG; TSE, 2011; TIMMERMAN et al., 2011; MEESTERS et al., 2012).

No entanto, alguns desafios ainda dificultam o uso generalizado da amostragem em DBS. A necessidade de extensa validação é uma das grandes desvantagens associadas. Isto é decorrente de dois importantes fatores, o primeiro deles reflete a influência do volume de sangue e homogeneidade no disco em decorrência das variações dos valores de hematócrito

(HCT) do sangue coletado. Todavia já existem alternativas para diminuir o impacto do HCT, uma delas é a utilização de todo o disco nas análises (WILHELM et al., 2014).

Os métodos analíticos para quantificação de fármacos em DBS requerem extensa validação, incluindo testes para avaliar o impacto do HCT na precisão (ANTUNES; CHARÃO; LINDEN, 2016; BEDOR et al., 2018). Além disso, como a bioanálise da maioria dos fármacos, com exceção dos imunossupressores, é realizada em plasma ou soro e os valores de referência são baseados nessas matrizes, uma validação clínica é obrigatória para traduzir adequadamente as concentrações do fármaco em DBS e os níveis plasmáticos correspondentes (CAPIAU et al., 2019).

Ensaio contemplando a quantificação de antirretrovirais em amostras de DBS já foram descritos e apresentaram as respectivas aplicações clínicas (KOAL et al., 2005; CASTILLO-MANCILLA et al., 2013; ZHENG et al., 2014; WAITT et al., 2017; DUTHALER et al., 2018; PRATHIPATI; MANDAL; DESTACHE, 2019), todavia, nenhum dos métodos avaliou em seus ensaios clínicos gestantes em uso de TARV.

Devido à pequena quantidade de amostra disponível para análise usando DBS, geralmente na faixa de 5 a 50 $\mu$ L, faz-se necessário o uso de métodos baseados em espectrometria de massas, tanto cromatografia gasosa (CG-MS) ou cromatografia líquida (LC-MS) associadas à espectrometria de massas, a qual une elevada sensibilidade e seletividade requerida para fins de MTF, em particular para as pequenas amostras provenientes de DBS (ANTUNES; CHARÃO; LINDEN, 2016).

### **3.9 Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de massas *in tandem* (LC-MS/MS)**

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade). As técnicas cromatográficas mais comumente acopladas à espectrometria de massas (*mass spectrometry* – MS) são a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography* – HPLC) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O acoplamento LC-MS é uma técnica analítica relativamente moderna e amplamente utilizada devido à sua alta sensibilidade e seletividade. No sistema LC-MS, os componentes

individuais de uma mistura são inicialmente separados na coluna, transferidos junto com a fase móvel para a fonte ionização e, em seguida, movem-se para o interior do espectrômetro de massas. Na prática clínica, quase todos os espectrômetros de massa são filtros de massa (quadrupolo – Q) simples ou *in tandem*. A tecnologia de filtros de massas *in tandem*, chamada de triploquadrupolo, acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência, LC-MS/MS, é a instrumentação que nos últimos 20 anos substituiu gradualmente CG-MS e LC-MS, com um único quadrupolo (SAINT-MARCOUX; SAUVAGE; MARQUET, 2007; CHARBE et al., 2019).

Um instrumento de LC-MS/MS consiste em uma fonte de ionização a pressão atmosférica, tipicamente uma fonte de ionização por eletronebulização (ou do inglês, *electrospray*) ou uma fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI), em seguida tem-se um compartimento de transição de pressão atmosférica para alto vácuo, logo depois se tem o primeiro filtro de massa (Q1), que leva a uma câmara de colisão (Q2) que pode ser preenchida com gás de baixa pressão para a dissociação induzida por colisão, seguido de uma segundo dispositivo de filtro de massa (Q3) e, finalmente, um detector de impacto de ionização (multiplicador de elétrons) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A necessidade de técnicas analíticas que sejam capazes de fornecer precisão, seletividade e produtividade são imprescindíveis para utilização na rotina de MTF. Atualmente, os imunossaios são utilizados mundialmente, principalmente para a MTF de certos imunossuppressores, antibióticos ou anticonvulsivantes. No entanto, essas tecnologias são inespecíficas para certos fármacos e estão sujeitas a interferências e detecção cruzada. Somado a isto, os custos dos reagentes e consumíveis são substanciais. Além dos imunossaios, a MTF pode ser realizada usando técnicas de LC acopladas a detectores específicos, como detectores de arranjo de diodo (LC-DAD) que são capazes de cobrir grande número de compostos relevantes. No entanto, a limitada especificidade dos espectros UV, sua variabilidade em função do pH e o fato de que muitos compostos apresentam pouca absorvância, tornou LC-DAD uma opção bastante limitada (SAINT-MARCOUX; SAUVAGE; MARQUET, 2007).

Inicialmente, as técnicas de LC-MS foram utilizadas principalmente em pesquisa, devido aos altos investimentos financeiros envolvidos e às dificuldades de implantação de procedimentos para atividades de rotina. Desde então, estas tecnologias foram disponibilizadas para um maior número de laboratórios graças à redução do custo e a utilização mais simplificada, assim como maior disponibilidade de recursos humanos com capacidade técnica para operacionalização. Como uma ilustração dessa realidade, Charbe e

colaboradores (2019) citam numerosos métodos de LC-MS/MS dedicados a MTF publicados nos últimos anos.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Substâncias e reagentes químicos

As substâncias químicas de referência (SQR) do RAL ( $\geq 98\%$ ), ATZ ( $\geq 98\%$ ) e do padrão interno (PI) lopinavir ( $\geq 98\%$ ) foram provenientes da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O EFZ (99,8%) foi adquirido da *United States Pharmacopeia* (Maryland, EUA) e o RTV ( $\geq 98\%$ ) foi doado pela Cristália Produtos Farmacêuticos Ltda (Itapira, Brasil). A água ultrapurificada (18 M $\Omega$ .cm) foi obtida utilizando sistema purificador da Purelab Option<sup>®</sup> (Elga<sup>®</sup>, Lane End, Reino Unido). Os solventes metanol e acetonitrila grau HPLC foram obtidos da J.T. Baker<sup>®</sup> (Phillipsburg, EUA). O ácido fórmico 85% e o sulfato de zinco (7.H<sub>2</sub>O) foram adquiridos da Synth<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil).

### 4.2 Preparo das soluções estoque e de trabalho

As soluções estoque de todos os analitos e PI foram preparadas em metanol a uma concentração de 1 mg/mL e foram mantidas a temperatura de -20° C. As soluções de trabalho foram preparadas diluindo as soluções estoque com metanol.

### 4.3 Preparo dos padrões de calibração e amostras de controle de qualidade em matriz

As soluções de trabalho foram diluídas dez vezes, para cada concentração, em plasma humano e sangue venoso para obter as amostras de calibração e controle de qualidade (CQ). As concentrações finais de cada analito em ambas as matrizes foram:

- a) RAL (15, 50, 100, 150, 300, 400, 500, 600, 800, 1.000 ng/mL; controle de qualidade baixo (CQB) = 45 ng/mL, controle de qualidade médio (CQM) = 500 ng/mL, controle de qualidade alto (CQA) = 850 ng/mL);
- b) ATZ e RTV (50, 100, 150, 200, 400, 800, 2.000, 5.000, 8.000, 10.000 ng/mL; CQB= 150 ng/mL, CQM= 5.000 ng/mL, CQA= 8.500 ng/mL);
- c) EFZ (50, 150, 200, 300, 400, 500, 1.000, 2.000, 4.000, 5.000 ng/mL; CQB= 300 ng/mL, CQM= 2.500 ng/mL, CQA= 4.240 ng/mL);
- d) Em todas as soluções a concentração final do PI foi 25 ng/mL.

Para as amostras de DBS, 50  $\mu$ L do padrão de calibração ou do CQ foram transferidos para os cartões de papel Whatman 903<sup>®</sup> usando uma pipeta volumétrica. Depois disso, os cartões permaneceram à temperatura ambiente durante, no mínimo, três horas. Para ambas as

matrizes, os padrões de calibração e amostras de CQ foram preparadas antes de cada corrida analítica.

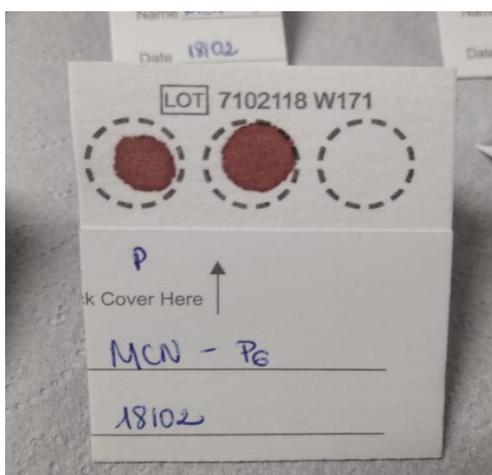
#### 4.4 Procedimento de extração dos analitos

Para os testes de extração dos analitos, foram testadas as técnicas de precipitação de proteínas e extração líquido-líquido. Os solventes testados para extração em ambas as matrizes foram: metanol puro, metanol + 0,1% de ácido fórmico, metanol: água (90:10, v/v), metanol: sulfato de zinco 200 mM (50:50, v/v), acetonitrila pura e metil terc-butil éter puro.

Para as amostras de plasma, uma alíquota de 50  $\mu$ L foi coletada e extraída com 450  $\mu$ L da solução extratora contendo o PI (25 ng/mL) em um tubo de polipropileno. Os tubos foram submetidos à agitação durante 15 minutos seguida de centrifugação por 5 min a 14.000 rpm e 4° C. O sobrenadante foi então coletado e transferido para microplacas de 96 poços para injeção em LC-MS/MS.

Para as amostras de DBS, o disco inteiro foi destacado (Figura 5) e transferido para um tubo de polipropileno contendo 500  $\mu$ L da solução extratora contendo o PI (25 ng/mL). A extração foi realizada através da agitação dos tubos por 30 minutos em temperatura ambiente ( $23 \pm 1^\circ$  C). As amostras foram submetidas à centrifugação durante 5 min (14.000 rpm a 4° C), o sobrenadante foi coletado e transferido para microplacas de 96 poços para injeção em LC-MS/MS.

**Figura 5** - Cartão de coleta contendo amostras de sangue seco. A área delimitada pela linha tracejada corresponde à área destacada para fins de extração, análise e quantificações dos analitos.



Fonte: Acervo pessoal.

#### 4.5 Análise em LC–MS/MS

As amostras foram analisadas utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Nexera<sup>®</sup> X2 UHPLC (Shimadzu<sup>®</sup>, Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas Sciex 3200<sup>®</sup> QTRAP (SCIEX<sup>®</sup>, Toronto, Canadá) equipado com fonte de ionização por eletronebulização Turbo IonSpray<sup>®</sup> e analisador triploquadropolo.

Os experimentos de infusão direta para otimização do monitoramento de reações múltiplas (MRM) foram realizados utilizando um sistema de seringa Harvard Apparatus 11 elite (Holliston, EUA) a um fluxo de 30 µL/min. O método de MRM foi elaborado incluindo as transições de massa mais intensas para os analitos e PI. Os parâmetros espectrométricos (tensão do cone, energia de colisão, temperatura da fonte e gás de dessolvatação) foram otimizados para obter a máxima sensibilidade na resolução unitária.

Os experimentos de quantificação foram realizados usando um sistema 30A LC System (Shimadzu<sup>®</sup>, Kyoto, Japão) equipado com duas bombas analíticas (LC-30AD), um degaseificador a vácuo (DGU-20A3), um amostrador automático (SIL-30AC) e um módulo controlador (CBM 20A).

Nos experimentos dedicados à obtenção da separação cromatográfica dos fármacos de interesse e escolha do PI, diversos testes foram realizados a fim de garantir a quantificação simultânea com adequada seletividade e resolução. Estão listadas no quadro a seguir as variações de coluna cromatográfica, fase móvel, fluxo, solução de lavagem do injetor, volume de injeção e padrão interno testadas no decorrer do desenvolvimento do método.

O programa de controle e a aquisição de dados utilizado foi o software Analyst<sup>®</sup> 1.5.2. Para a quantificação e construção das curvas de calibração, o MultiQuant<sup>®</sup> 3.0 foi empregado.

**Quadro 2** - Variações cromatográficas testadas no desenvolvimento do método bioanalítico.

Parâmetro	Variações
Coluna Cromatográfica	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Shim-pack C18 150x2 mm, tamanho de partícula de 2,2 µm;</li> <li>▪ Kinetex C18 100x3 mm, tamanho de partícula 2,6 µm;</li> <li>▪ Kinetex C18 50x3 mm, tamanho de partícula 2,6 µm;</li> <li>▪ Kinetex XB C18 50x2,1 mm, tamanho de partícula 2,6 µm;</li> <li>▪ ACE C18 50x4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm;</li> <li>▪ Shim-pack C18 150x4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm.</li> </ul>
Fase móvel (A)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Água</li> <li>▪ Água + 0,1% de ácido fórmico;</li> <li>▪ Água + 0,1% de ácido acético;</li> <li>▪ Acetato de amônio 10 mM;</li> <li>▪ Formiato de amônio 5 mM.</li> </ul>
Fase móvel (B)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Metanol;</li> <li>▪ Metanol + 0,1% de ácido fórmico;</li> <li>▪ Acetonitrila;</li> <li>▪ Acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico;</li> <li>▪ Acetonitrila + 0,1% de ácido acético.</li> </ul>
Tipo de eluição	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Isocrática;</li> <li>▪ Gradiente.</li> </ul>
Solução de Lavagem do Injetor	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Metanol 100%;</li> <li>▪ Metanol: Isopropanol: Acetonitrila (50:25:25, v/v);</li> <li>▪ Metanol: Isopropanol: Água (50:25:25, v/v) + 0,1% de ácido fórmico;</li> <li>▪ Acetonitrila: Metanol (50:50, v/v) + 0,1% ácido fórmico.</li> </ul>
Fluxo (mL/min)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 0,4; 0,5; 1,0.</li> </ul>
Volume de injeção (µL)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 1; 2; 3; 5; 7;10.</li> </ul>
Padrão interno	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cimetidina;</li> <li>▪ Nevirapina;</li> <li>▪ Lopinavir.</li> </ul>

Fonte: Autoria própria.

## 4.6 Validação do método bioanalítico

A validação do método bioanalítico foi delineada com base nas diretrizes do FDA e ANVISA (FDA, 2018; ANVISA, 2012). Os parâmetros de validação consistiram em seletividade, efeito residual, detecção cruzada, linearidade, precisão, exatidão, efeito matriz, recuperação, eficiência do processo e estabilidade. Adicionalmente, para as amostras de DBS, os efeitos do HCT e do volume na quantificação dos analitos foram avaliados conforme estabelecido (CAPIAU et al., 2019).

### 4.6.1 SELETIVIDADE, EFEITO RESIDUAL E DETECÇÃO CRUZADA

Para avaliar a seletividade, sangue e plasma humanos brancos provenientes de cinco doadores em jejum e um de doador recém-alimentado (plasma lipêmico), além de uma amostra hemolisada, foram utilizados. A seletividade frente à dupla de ITRNs, TDF e 3TC, também foi avaliada através da contaminação de cada matriz com as SQR de ambos a uma concentração de 400 ng/mL.

O efeito residual foi determinado através da análise, em triplicata, de amostras branco antes e após a injeção de amostras extraídas dos analitos no limite superior de quantificação (LSQ) e posterior comparação às respostas de amostras no limite inferior de quantificação (LIQ).

A possibilidade de detecção cruzada foi investigada através da injeção, em triplicata, de soluções de LSQ (sem matriz) de cada analito e PI (25 ng/mL), separadamente.

### 4.6.2 LINEARIDADE, PRECISÃO E EXATIDÃO

Quatro curvas analíticas diferentes foram preparadas em cada matriz, utilizando sangue com HCT de 40% e seu respectivo plasma, e as soluções padrão foram injetadas em três dias diferentes. O ponto zero (branco + PI) foi usado como ferramenta de controle de qualidade e para ajustar o “zero instrumental”. A linearidade foi determinada utilizando o método dos mínimos quadrados ponderados considerando  $1/x$  como fator de ponderação, onde  $x$  é a concentração do analito. O critério de aceitação para cada concentração padrão retrocalculada foi de  $\pm 15\%$  de desvio do valor nominal, exceto para o LIQ que foi fixado em  $\pm 20\%$ .

A precisão (desvio padrão relativo - DPR) e exatidão (erro relativo - ER) foram estimadas usando quatro níveis de concentração: LIQ, CQB, CQM e CQA. Para cada nível de concentração, cinco réplicas foram preparadas e analisadas no mesmo dia, para avaliação da

precisão e exatidão intracorrída, e em três dias diferentes, para avaliação da precisão e exatidão intercorrída. Os valores de DPR e ER aceitáveis devem ser inferiores a 15% e inferiores a 20% para as amostras de LIQ.

#### 4.6.3 EFEITO MATRIZ, RECUPERAÇÃO E EFICIÊNCIA DO PROCESSO

O efeito matriz (EM), a recuperação (REC) e a eficiência do processo (EP) em cada matriz (DBS e plasma) foram avaliados considerando as respostas (*Analito/PI*) em DBS, plasma, e metanol nos níveis de CQB, CQM e CQA de acordo com as seguintes equações (MATUSZEWSKI, CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003):

$$EM (\%) = \frac{B}{A} \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

$$REC (\%) = \frac{C}{B} \times 100 \text{ (Eq. 2)}$$

$$EP (\%) = \frac{C}{A} \times 100 \text{ (Eq. 3)}$$

Onde A é definido como a área do pico de amostras de controle de qualidade puro preparadas em metanol; B é o branco de matriz extraído e depois adicionado dos analitos; e C é a matriz enriquecida com os analitos e extraída. Foram analisadas cinco réplicas de cada solução.

Para complementar a avaliação da influência da matriz na resposta analítica, duas abordagens adicionais foram utilizadas. Uma delas qualitativa, envolveu a infusão concomitante em LC-MS/MS de uma amostra branco de DBS extraída e uma solução contendo todos os analitos e PI a uma concentração de 400 ng/mL infundida de forma direta no espectrômetro de massas. Através desse ensaio é possível visualizar no cromatograma a ocorrência de efeitos de supressão ou incremento da ionização nos tempos de retenção dos analitos e PI em decorrência de componentes da matriz.

A segunda abordagem adicional foi o cálculo do fator de matriz normalizado (FMN), determinado através da divisão da resposta dos analitos em matriz nos níveis CQB e CQA por aquela obtida nos mesmos valores nominais em metanol (Equação 4). Foram analisadas cinco réplicas de cada solução (ANVISA, 2012).

$$FMN = \frac{\text{Resposta dos analitos em matriz}}{\text{Resposta dos analitos em metanol}} \text{ (Eq. 4)}$$

#### 4.6.4 ESTABILIDADE

A estabilidade dos analitos foi avaliada através dos seguintes estudos:

- a) Estabilidade de bancada em amostras de DBS;
- b) Estabilidade de curta duração em amostras de solução estoque, DBS e plasma;
- c) Estabilidade pós-processamento em amostras de DBS e plasma.

Os estudos de estabilidade foram conduzidos em amostras contendo os analitos em dois níveis de concentração (CQB e CQA), com análises em triplicata. As amostras foram analisadas juntamente com uma curva analítica fresca e as concentrações foram determinadas. A porcentagem de degradação foi obtida por comparação do valor experimental e nominal. A estabilidade foi considerada aceitável quando todos os resultados estavam dentro do intervalo de  $\pm 15\%$  de desvio em relação a concentração nominal.

Para avaliação da estabilidade de bancada, amostras de CQ foram preparadas utilizando sangue fortificado com os analitos conforme descrito anteriormente (Seção 4.3) e os cartões de coleta foram mantidos à temperatura ambiente ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) por 8 h antes de serem processados e analisados.

Para determinação da estabilidade de curta duração dos analitos na solução estoque (Seção 4.2), amostras de CQ foram preparadas em metanol a partir de soluções estoque armazenadas à  $-20^\circ\text{C}$  durante 7 ou 30 dias.

Para avaliação da estabilidade de curta duração das amostras de DBS durante o armazenamento, amostras de CQ foram preparadas utilizando sangue fortificado com os analitos conforme descrito anteriormente (Seção 4.3) e, após o período de secagem, os cartões de coleta foram acondicionados em embalagens seladas de alumínio contendo pacote dessecante à temperatura ambiente ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 24 h ou 7 dias. O mesmo procedimento foi realizado para avaliar a estabilidade durante 7 dias a uma temperatura de  $40 \pm 1^\circ\text{C}$ . Já na avaliação da estabilidade de curta duração de amostras de plasma, as amostras de plasma fortificadas com os analitos foram mantidas na geladeira ( $2^\circ\text{C} - 8^\circ\text{C}$ ) durante 24 h ou 7 dias antes de serem extraídas e analisadas.

A estabilidade pós-processamento das amostras de DBS e plasma foi avaliada após seu processamento, extração e acondicionamento durante 6 h no amostrador automático a  $5^\circ\text{C}$ .

#### 4.6.5 EFEITO DO HEMATÓCRITO

Os valores de HCT avaliados neste estudo (20%, 30% e 60%) foram escolhidos com base em intervalos de referência do HCT durante uma gestação saudável de acordo com o

trimestre: primeiro (31–41%), segundo (30–39%) e terceiro (28–40%) (ABBASSI-GHANA VATI; GREER; CUNNINGHAM, 2009; MORTON, 2021).

Para avaliação do efeito do HCT em amostras de DBS, alíquotas de sangue de HCT conhecido (40%) foram combinadas com volumes apropriados de células vermelhas ou plasma obtidos após centrifugação de sangue total com anticoagulante (KOSTER et al., 2015) a fim de obter os valores alvo de 20, 30 e 60%. Os valores de HCT foram confirmados através de medição usando uma centrífuga de microhematócrito e um leitor capilar (Sigma Laborzentrifugen<sup>®</sup>, Sigma 1- 14). Em seguida, essas amostras foram enriquecidas com os analitos para atingir as concentrações de CQB e CQA, gotejadas em cartão de coleta, secas e então analisadas. O ensaio foi realizado em triplicata e as concentrações experimentais foram determinadas utilizando uma curva analítica elaborada com sangue de HCT de 40%.

A influência do HCT nas medições de analitos foi determinada por teste estatístico (One-way ANOVA com análise post hoc Bonferroni) usando GraphPad Prism versão 9.0.1 para Windows, software GraphPad (La Jolla Califórnia, EUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

#### 4.6.6 EFEITO DE VOLUME

A avaliação do efeito do volume gotejado em amostras de DBS foi conduzida em triplicata utilizando sangue com HCT de 40% e os analitos adicionados até atingir as concentrações de CQB e CQA. As amostras de sangue foram então transferidas para o cartão de coleta nos volumes de 20, 30 e 55  $\mu$ L utilizando uma micropipeta. Após a secagem, as amostras de DBS foram extraídas e analisadas juntamente com uma curva analítica preparada com 50  $\mu$ L de sangue (HCT 40%) gotejado. O ER de  $\pm 15\%$  e DPR de  $\leq 15\%$  demonstram ausência de efeito do volume na quantificação das amostras de DBS.

#### 4.7 Coleta de amostras biológicas

As amostras de sangue obtidas por punção venosa foram coletadas por profissional capacitado em tubos de coleta contendo heparina de lítio S-Monovette<sup>®</sup> de 4,5 mL, provenientes da Greiner Bio One (Rhineland, Alemanha). Para obtenção de plasma, as amostras de sangue foram submetidas à centrifugação a 3.000 rpm durante 3 minutos com posterior separação do sobrenadante.

Para as amostras de DBS, a participante foi submetida a uma injúria no dedo realizada por profissional capacitado utilizando lanceta Accu Chek<sup>®</sup> Safe T Pro Uno da Roche<sup>®</sup> (Basileia, Suíça) após assepsia da área. A primeira gota emergente foi desprezada e, em

seguida, depositou-se duas gotas de sangue nos cartões de coleta Whatman 903<sup>®</sup>, obtidos da GE Healthcare (Chicago, EUA).

#### 4.8 Validação clínica

Um quantitativo de sete pacientes grávidas infectadas pelo HIV-1 em tratamento com um dos analitos alvo, o EFZ, participaram do estudo de validação clínica. Para tal, foram considerados três tipos de amostras provenientes de uma mesma participante e coletadas no mesmo horário:

- a) Sangue total obtido por punção venosa gotejado (50 µL) com pipeta volumétrica em cartão de coleta para obtenção da Concentração Central em DBS;
- b) Plasma obtido por centrifugação do sangue total restante para obtenção da Concentração Plasmática (ver Seção 4.7);
- c) Sangue obtido por injúria no dedo gotejado em cartão de coleta para obtenção da Concentração Periférica em DBS (ver Seção 4.7).

As participantes encontravam-se em uso de TARV composta de EFZ (600 mg), TDF (300 mg) e 3TC (300 mg) associados em um único comprimido administrado uma vez ao dia. As amostras de sangue foram coletadas 10 h após a administração oral do comprimido em jejum e, em seguida, no intervalo de 1 h até que 6 coletas fossem obtidas para cada participante. As concentrações de EFZ foram então determinadas utilizando o método bioanalítico desenvolvido.

Para avaliar a relação entre as concentrações central (sangue venoso pipetado), periférica (sangue coletado pós-injúria no dedo) em DBS e plasmática, a regressão de Passing Bablok foi realizada (PASSING; BABLOK, 1983). As amostras coletadas da mesma participante e no mesmo tempo foram então comparadas de forma pareada: concentração central em DBS x concentração plasmática; concentração periférica em DBS x concentração plasmática; e concentração central em DBS x concentração periférica em DBS. A abordagem de Bland-Altman (BLAND; ALTMAN, 1999) também foi aplicada para avaliação de concordância entre as medidas. Todas estas análises foram realizadas no MedCalc<sup>®</sup> Software Statistical versão 18.5 (Ostend, Bélgica; <http://www.medcalc.org>; 2018).

#### 4.9 Modelagem Farmacocinética Populacional

Para análise farmacocinética populacional foi utilizado Pmetrics versão 1.9.7 do pacote R. O processo de construção do modelo seguiu uma abordagem passo a passo com:

- a) Determinação do modelo de base estrutural;
- b) Seleção do modelo de erro estatístico mais adequado;
- c) Desenvolvimento de modelo de covariável;
- d) Avaliação do modelo.

#### 4.9.1 DETERMINAÇÃO DO MODELO DE BASE ESTRUTURAL

Modelos estruturais lineares e não lineares foram testados para os dados de concentração-tempo. A eliminação do EFZ do compartimento central foi modelada como um processo linear assim como as constantes de distribuição intercompartimental. Modelos de erros aditivo e multiplicativo também foram testados.

#### 4.9.2 DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE COVARIÁVEL

As covariáveis clínicas disponíveis foram avaliadas quanto à plausibilidade biológica e posteriormente avaliadas na análise de covariáveis. Tais dados foram provenientes dos registros mais recentes de exames laboratoriais disponíveis no prontuário e, complementarmente, através de entrevista com a participante no dia de coleta das amostras (Apêndice A).

As covariáveis selecionadas que foram testadas nos parâmetros do modelo estrutural incluem: raça, peso, idade gestacional, uso de álcool e/ou cigarro, contagem de células TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> e carga viral. Um algoritmo padrão de avaliação de covariáveis foi seguido por adição direta de forma gradual.

#### 4.9.3 AVALIAÇÃO DO MODELO

A avaliação do modelo foi realizada por gráficos diagnósticos e exame estatístico para comparação e seleção dos modelos. Em primeiro lugar, a qualidade do ajuste e o coeficiente de determinação da regressão linear dos valores observados e previstos dos gráficos ( $R^2$  mais próximo de 1, intercepto mais próximo de 0) foi avaliada visualmente para cada modelo. Em segundo lugar, uma comparação dos métodos pelo teste de razão de verossimilhança, *log-likelihood ratio test* ( $-2*LL$ ), e *Akaike information criterion* (AIC). Por fim, avaliando a consistência interna das predições do modelo com as observações, os erros de distribuição de predição normalizada (EDPN) e a verificação preditiva posterior foram avaliados graficamente e a proporção de observações simuladas entre 5° e 95° percentis acima de 90% foram considerados adequados.

#### 4.10 Monitorização Terapêutica

Para aplicação da MTF, sete participantes foram submetidas a coleta de amostra biológica, conforme descrito nas Seções 4.7 e 4.8, além de coleta de informações antropométricas e de estilo de vida. Uma avaliação de farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) foi realizada através da correlação observada entre achados farmacocinéticos e principais marcadores farmacodinâmicos de eficácia da TARV (contagem de células TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> e carga viral) em gestantes em uso de EFZ como parte do esquema terapêutico.

#### 4.11 Considerações éticas

##### 4.11.1 SELEÇÃO DAS PARTICIPANTES

As participantes foram recrutadas em um serviço de referência (Anexos A e B) no acompanhamento obstétrico de gestantes vivendo com HIV no estado de Pernambuco de acordo com o atendimento aos critérios de inclusão definidos. Foram eles:

- Pacientes em uso de TARV (com esquema abrangendo pelo menos um dos fármacos alvo neste estudo), com idade igual ou superior a 18 anos, cadastradas e em acompanhamento ambulatorial no serviço;
- Apresentar disponibilidade para fornecer informações básicas e dados sociodemográficos;
- Fornecer consentimento livre e esclarecido por escrito antes do início de qualquer procedimento do estudo (Apêndice B);
- Possibilidade de aderir ao cronograma do estudo.

##### 4.11.2 RISCOS E BENEFÍCIOS

O estudo ofereceu, de forma geral, potencial beneficência, uma vez que objetivou a compreensão e otimização da farmacoterapia antirretroviral, e não-maleficência às suas participantes. Todavia, por envolver entrevista com questionamentos de cunho pessoal, há o risco de constrangimento da participante, tal risco foi minimizado através do treinamento adequado do entrevistador e realização da entrevista em ambiente reservado. A participante teve assegurada a liberdade de negar-se a responder qualquer questionamento que a deixasse em situação desconfortável ou de constrangimento.

No que diz respeito à coleta de amostras biológicas, as amostras foram coletadas por profissional capacitado. Durante as coletas houve potencial desconforto ou leve dor em

decorrência das injúrias necessárias para a punção venosa no antebraço e no dedo. Em caso de ocorrência de qualquer dano ou prejuízo decorrentes dos procedimentos de coleta de sangue foram tomadas as providências necessárias para a recuperação sem consequências negativas para a participante, sendo a equipe de pesquisadores responsável pela tomada das ações preventivas, corretivas e de custeio.

No geral, os riscos deste estudo foram gerenciáveis e as participantes não estavam submetidas a qualquer dano significativo ou duradouro.

#### 4.11.3 RESOLUÇÃO Nº 466/12 DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE/MS

O estudo foi conduzido de acordo com os princípios da Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

O protocolo de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco e aprovado sob o número de CAAE 85694318.9.0000.5208 (Anexo C). Foi obtido o consentimento informado de todas as participantes, após esclarecimento sobre o escopo da pesquisa, objetivos, benefícios para seu tratamento, riscos potenciais ou danos decorrentes da pesquisa. A participante foi devidamente esclarecida ainda sobre o seu direito de se recusar a participar do estudo, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que haja para tanto qualquer condição além de sua própria vontade.

Os dados deste estudo foram considerados como propriedade conjunta das partes envolvidas e conseqüentemente, não devem ser comunicados a terceiros por uma das partes, sem autorização das outras. Fica, no entanto, comprometido a tornar público os resultados sejam favoráveis ou não. As informações desta pesquisa são confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos participantes, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação.

Os dados provenientes da execução deste estudo serão armazenados por um período de 5 anos em pastas de arquivo em sala dedicada no Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC), localizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob responsabilidade da pesquisadora principal.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento do método

Para todos os analitos e PI, foram testadas a ionização por eletronebulização em modo positivo e negativo. No entanto, apenas o EFZ mostrou um aumento significativo na intensidade do sinal em modo negativo em comparação com o modo positivo. Embora sejam raros, é possível encontrar relatos na literatura sobre análise de EFZ em LC-MS/MS com ionização em modo positivo. Como o trabalho de Jung e colaboradores (2007) que desenvolveram um método para quantificação de 17 antirretrovirais em plasma humano, incluindo o EFZ, utilizando LC-MS/MS com ionização por eletronebulização em modo positivo.

Diante do não comprometimento da sensibilidade necessária para o EFZ e, assim, prejuízo na aplicabilidade do método na determinação das concentrações, foi utilizada ionização por eletronebulização em modo positivo para todos os analitos. A voltagem capilar foi ajustada para 5.5 kV e o turbogás aquecido foi utilizado com vazão de 45 L/min a 650° C. As transições de massa monitoradas no modo MRM para cada composto e as condições espectrométricas otimizadas para obtenção dos íons produto mais intensos estão presentes na Tabela 1.

**Tabela 1** - Condições espectrométricas utilizadas para monitoramento das transições de massa no modo MRM para raltegravir (RAL), atazanavir (ATZ), ritonavir (RTV), efavirenz (EFV) e lopinavir (PI).

Composto	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
<b>RAL</b>	445,2	109,2	46	9,0	22,00	39	4
<b>ATZ</b>	705,2	168,2	76	5,5	25,67	53	4
<b>RTV</b>	721,2	140,2	56	6,5	25,97	75	4
<b>EFZ</b>	316,4	244,2	41	5,5	18,00	18	8
<b>PI</b>	629,2	155,2	51	6,5	24,24	59	4

EP (*entrance potential*), DP (*declustering potential*), CEP (*collision cell entrance potential*), CE (*collision energy*) e CXP (*collision cell exit potential*).

Fonte: A autoria própria.

Durante o desenvolvimento do método, as condições de LC-MS/MS foram otimizadas para alcançar a quantificação simultânea dos quatro antirretrovirais. Para tanto, foram testadas diversas associações dos parâmetros ilustrados no Quadro 2. Todas as colunas utilizadas nos testes foram C18, as colunas Shim-pack C18 150x2 mm 2,2 µm e Shim-pack C18 150x4,6

mm 5  $\mu$ m apresentaram melhores resultados de separação cromatográfica em comparação com as demais. A coluna Shim-pack C18 150x2 mm 2,2  $\mu$ m apresentou possível “entupimento” causando vazamento em diferentes tubulações no equipamento de LC-MS/MS, sendo, por isso, descartada. A coluna Shim-pack C18 150x4,6 mm 5  $\mu$ m foi então utilizada na continuação dos testes de desenvolvimento.

A composição da fase móvel também sofreu inúmeras variações no decorrer dos testes nas diferentes colunas. A adição de soluções tampão na fase aquosa foi utilizada com uma estratégia de resolução de problemas de assimetria de pico cromatográfico (BORGES; GORAIEB; COLLINS, 2012) observado em algumas colunas, como não se observou melhora, os tampões foram descartados da triagem. Os solventes testados como fase orgânica foram metanol e acetonitrila, no entanto, não foi observada diferença significativa entre os dois e, por questões de valor financeiro agregado, o metanol foi escolhido para composição final. A adição de ácido acético ou fórmico na fase orgânica e aquosa foi testada como uma estratégia de incremento de ionização dos analitos em modo positivo, favorecendo uma abundância de prótons  $[H^+]$  no ambiente (LANÇAS, 2009). Não foram detectadas diferenças significativas na ionização quando adicionado ácido acético ou fórmico, portanto, por questões de conveniência, a adição de 0,1% de ácido fórmico na composição final da fase móvel foi padronizada na análise.

A eluição em modo isocrático foi testada nos ensaios preliminares, todavia, a necessidade de maior resolução entre os picos cromatográficos e de maior retenção dos analitos e PI frente a um possível efeito da matriz biológica nos primeiros minutos de corrida analítica, justificou a opção por um método de gradiente. O fluxo com que a fase móvel foi impulsionada dentro do equipamento sofreu pequenas variações em virtude basicamente das dimensões da coluna utilizada em cada teste. Como a coluna utilizada no método final apresentava dimensões de 150x4,6 mm e tamanho de partícula de 5  $\mu$ m, o fluxo utilizado foi 1 mL/min, obtendo-se uma adequada pressão de trabalho (25MPa).

Uma separação cromatográfica apropriada foi então alcançada utilizando como fase móvel metanol + 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e água + 0,1% ácido fórmico (solvente B) em modo de eluição gradiente, conforme esquematizado na Tabela 2. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Shim-pack<sup>®</sup> C18, 4,6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m de tamanho de partícula (Shimadzu<sup>®</sup>, Kyoto, Japão), com fluxo de 1,0 mL/min e um tempo de corrida de 6 min. O tempo de retenção dos analitos em min foi: RAL= 3,1 min; ATZ= 4,2 min; RTV= 4,4 min; EFZ= 4,1 minutos; PI = 4,7 min (Figura 6).

**Tabela 2** - Composição do gradiente da fase móvel utilizado no método bioanalítico.

Tempo (min)	Variação % da fase móvel
	B
0,0 – 0,4	40
0,4 – 1,0	40 → 90
1,0 – 4,5	90
4,5 – 4,8	90 → 40
4,8 – 6,0	40

→ : Aumento ou decaimento linear.

Fonte: Autoria própria.

O volume de injeção de amostra também variou em função das dimensões e tamanho de partícula da coluna utilizada em cada teste, todavia, observou-se ainda o impacto do volume injetado na sensibilidade e intensidade da resposta no equipamento. Tendo em vista a coluna incluída na composição final do método e a melhor resposta instrumental obtida (isto é, maior intensidade de sinal), o volume de injeção com melhores resultados foi de 7 µL. Em virtude de efeito residual observado, especialmente para o EFZ, a solução de lavagem da agulha do injetor precisou ser otimizada. Aquela onde se obteve menor efeito residual foi a solução composta de acetonitrila: metanol (50:50, v/v) com 0,1% ácido fórmico.

A escolha do PI a ser utilizado no método considerou achados da literatura e similaridade de propriedades físico-químicas com os analitos. Para isto, cimetidina (JUNG et al., 2007), nevirapina e lopinavir foram testados. Dentre eles, o lopinavir (LPV) apresentou os melhores resultados de separação cromatográfica e de variabilidade e, portanto, foi utilizado como PI no método desenvolvido. Considerando que o LPV também é um fármaco antirretroviral, é importante destacar que ao aplicar este método, os pacientes não podem estar em uso de TARV que o contenha. Esta limitação teve pouca relevância em nossa aplicação clínica, visto que no Protocolo e Diretrizes Clínicas adotadas no Brasil para tratamento do HIV em gestantes este medicamento não está incluído em nenhum dos esquemas preferenciais (BRASIL, 2019). Além disso, de acordo com as Recomendações do Painel sobre Regimes de Medicamentos Antirretrovirais e Resultados Maternos e Neonatais nos Estados Unidos (2020), TARV que contém LPV potencializado com RTV pode aumentar o risco de parto prematuro em comparação com outros regimes à base de IP potencializados, razão pela qual o LPV não estaria incluído em regimes iniciais de primeira linha durante a gravidez. É importante ressaltar ainda que apesar do uso de padrão interno deuterado ser o mais indicado, o método mostrou-se adequado com o PI escolhido que é econômica e logisticamente mais

acessível. A tabela abaixo sumariza todas as especificações cromatográficas do método desenvolvido.

**Tabela 3** - Condições cromatográficas finais do método bioanalítico desenvolvido.

<b>Condição cromatográfica</b>	<b>Descrição</b>
Coluna	Shim-pack C18 150x4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm
Fase móvel (A)	Água + 0,1% de ácido fórmico
Fase móvel (B)	Metanol + 0,1% de ácido fórmico
Tipo de eluição	Gradiente
Solução de Lavagem do Injetor	Acetonitrila: Metanol (50:50, v/v) com 0,1% ácido fórmico
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	7 µL
Padrão interno	Lopinavir

Fonte: Autoria própria.

## 5.2 Procedimento de extração dos analitos

As tabelas 4 e 5 mostram os resultados de recuperação obtidos nos ensaios de triagem de solventes utilizados para extração dos analitos das matrizes biológicas, realizados em triplicata.

**Tabela 4** - Recuperação média dos analitos em DBS.

<b>Analito</b>	<b>RAL</b>	<b>ATZ</b>	<b>RTV</b>	<b>EFZ</b>
<b>Solvente</b>	<b>%REC (DPR)</b>	<b>%REC (DPR)</b>	<b>%REC (DPR)</b>	<b>%REC (DPR)</b>
Metil terc-butil éter	0,37 (34,48)	0,25 (3,15)	0,10 (14,22)	4,18 (23,34)
Metanol	22,23 (3,83)	71,04 (1,78)	64,40 (3,85)	78,94 (10,55)
Metanol + 0,1% de ácido fórmico	138,26 (8,77)	76,16 (1,05)	58,68 (1,64)	63,71 (14,16)
Metanol/Água (90:10)	124,11 (4,33)	78,09 (8,63)	82,24 (14,57)	67,74 (6,43)
Acetonitrila	1,33 (27,80)	1,10 (12,66)	0,75 (18,73)	5,10 (49,95)

%REC: percentual de recuperação; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 5** - Recuperação média dos analitos em plasma.

<b>Analito</b>	<b>RAL</b>	<b>ATZ</b>	<b>RTV</b>	<b>EFZ</b>
<b>Solvente</b>	%REC (DPR)	%REC (DPR)	%REC (DPR)	%REC (DPR)
Metil terc-butil éter	6,69 (9,67)	42,31 (3,20)	38,40 (7,67)	67,99 (4,04)
Metanol	95,65 (0,19)	82,98 (1,64)	84,25 (0,26)	83,74 (5,59)
Metanol + 0,1% de ácido fórmico	130,84 (2,63)	96,44 (2,00)	84,57 (3,36)	77,31 (11,26)
Metanol/Água (90:10)	139,52 (0,80)	94,66 (0,40)	98,95 (1,28)	88,61 (6,76)
Acetonitrila	147,90 (0,78)	90,66 (1,34)	93,12 (2,72)	89,46 (3,58)

%REC: percentual de recuperação; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Autoria própria.

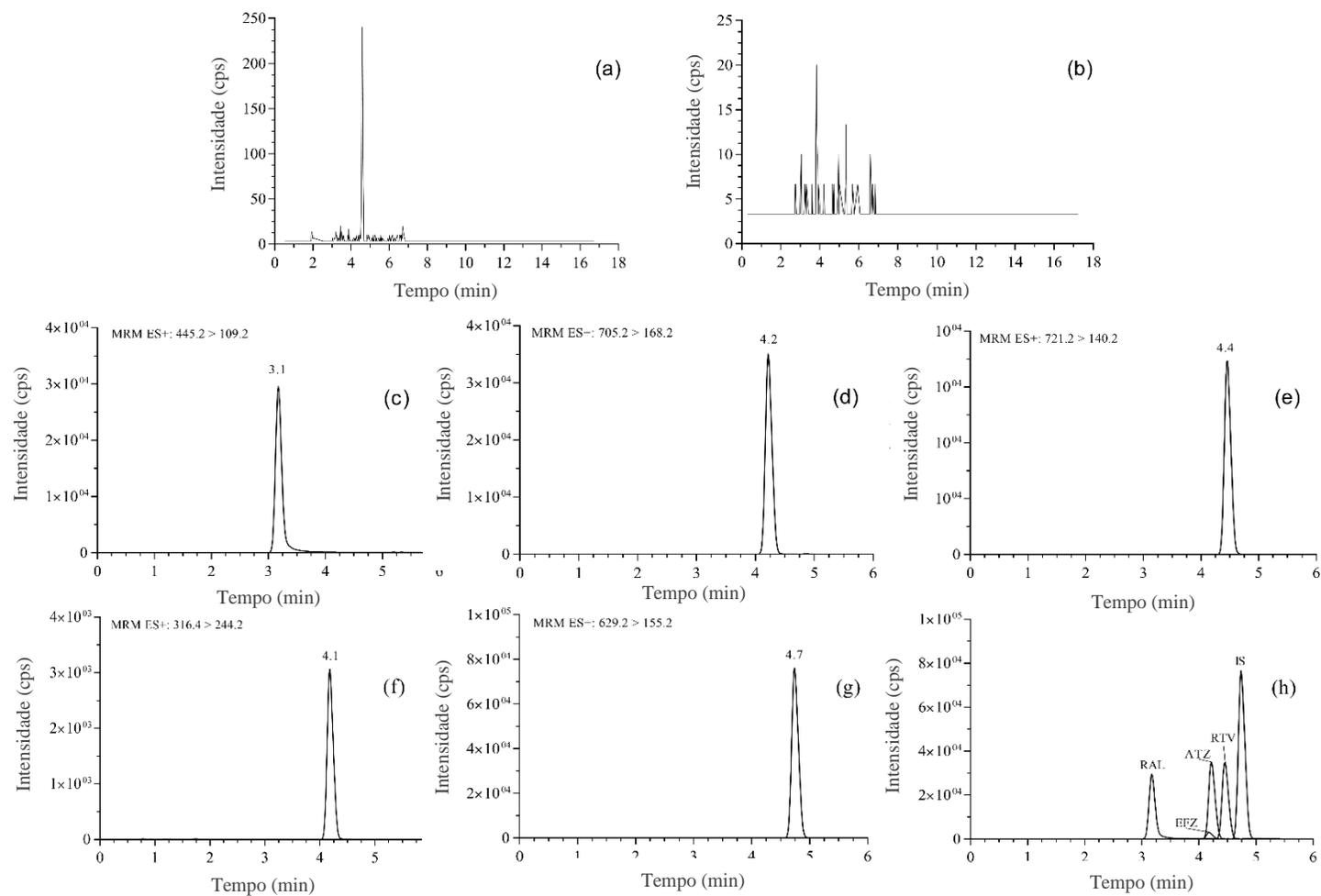
Durante a análise crítica dos dados de recuperação obtidos dos testes preliminares, resultados satisfatórios utilizando metanol puro para amostras de plasma foram encontrados, sendo este então utilizado como solvente extrator para tais amostras. Todavia, o metanol puro produziu uma baixa recuperação para o RAL (22,23%) em amostras de DBS, não sendo possível, portanto, quantificar com precisão e exatidão as amostras de LIQ. Com base no uso conhecido na literatura do zinco sulfato para precipitação de proteínas e lise de células, em ensaio de sangue total (POLSON et al., 2003) e sua aplicabilidade em estudos de antirretrovirais em DBS (KOAL et al., 2005; KROMDIJK et al., 2012), uma solução de metanol/sulfato de zinco 200 mM (50:50) foi testada e forneceu resultados satisfatórios para todos os analitos em amostras de DBS (ver Seção 5.3.5).

### 5.3 Validação do método bioanalítico

#### 5.3.1 SELETIVIDADE

A seletividade foi determinada através da comparação dos cromatogramas de amostras branco de DBS e plasma com os de amostras enriquecidas com o LIQ nas respectivas matrizes (Figura 6). Não houve interferências endógenas > 20% do sinal do LIQ dos analitos, nem > 5% do sinal do PI. Nenhuma interferência também foi detectada na presença de TDF e 3TC. O método foi, portanto, considerado seletivo.

**Figura 6** - Cromatogramas do RAL, ATZ, RTV, EFZ e PI: (a) branco DBS, (b) branco plasma, (c) LIQ RAL, (d) LIQ ATZ, (e) LIQ RTV, (f) LIQ EFZ, (g) PI e (h) LIQ Simultâneo.



Fonte: Autoria própria.

### 5.3.2 EFEITO RESIDUAL E DETECÇÃO CRUZADA

Nenhum pico cromatográfico residual ou interferência entre os canais MRM foi observada após as injeções de amostras de LSQ dos analitos durante os ensaios de efeito residual e detecção cruzada, respectivamente. Para todos os testes, a resposta nas amostras branco de DBS e plasma foram  $\leq 20\%$  da resposta média do LIQ e  $\leq 5\%$  da área do pico do PI.

### 5.3.3 LINEARIDADE E CURVA DE CALIBRAÇÃO

A linearidade foi determinada através da plotagem da razão da área dos analitos em relação a área do PI (y) *versus* a concentração nominal (x). A curva analítica foi linear com valores de coeficiente de correlação ( $r^2$ ) superiores a 0,99, conforme mostrado na Tabela 6. Os valores de  $r^2$ , inclinação e interceptos foram calculados utilizando análise de regressão linear com ponderação ( $1/x$ ) para todos os analitos em ambas as matrizes.

**Tabela 6** - Valores de coeficiente de correlação ( $r^2$ ) para os intervalos lineares dos analitos em DBS e plasma.

Analito	Intervalo linear (ng/mL)	$r^2$ ( $\pm$ DP)	
		DBS	Plasma
RAL	15 – 1.000	0,9953 $\pm$ 0,0037	0,9944 $\pm$ 0,0055
ATZ	50 – 10.000	0,9986 $\pm$ 0,0008	0,9964 $\pm$ 0,0043
RTV	50 – 10.000	0,9971 $\pm$ 0,0027	0,9960 $\pm$ 0,0028
EFZ	50 – 5.000	0,9974 $\pm$ 0,0017	0,9956 $\pm$ 0,0024

DP: desvio padrão.

Fonte: Autoria própria.

A escolha dos intervalos de concentração utilizados na curva de calibração baseou-se em parâmetros farmacocinéticos disponíveis na literatura para RAL (ARAB-ALAMEDDINE et al., 2011; CATTANEO et al., 2012), ATZ (TIEC et al., 2005; ANDERSON et al., 2009), RTV (ANDERSON et al., 2009; AGÊNCIA EUROPEIA DE MEDICAMENTOS, 2017) e EFZ (MARZOLINI et al., 2001) em adultos em tratamento oral do HIV, a fim de garantir a aplicação do método para monitorização terapêutica e outros estudos farmacocinéticos.

As concentrações retrocalculadas para os padrões de calibração permaneceram dentro de  $\pm 20\%$  da concentração nominal para o LIQ e dentro de  $\pm 15\%$  para todos os outros níveis, conforme demonstrado nas Tabelas 7, 8, 9 e 10 para amostras de DBS e Tabelas 11, 12, 13 e 14 para as amostras de plasma.

**Tabela 7** - Linearidade em amostras de DBS para o RTV.

<b>Amostra</b>	<b>Conc. Experimental (ng/mL) Média (± DP)</b>	<b>Conc. Nominal (ng/mL)</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>ER (%)</b>
<b>CCLIQ</b>	50,09 ± 1,20	50	2,40	0,19
<b>CC2</b>	95,90 ± 6,12	100	6,39	-4,10
<b>CC3</b>	132,58 ± 4,35	150	3,29	-11,61
<b>CC4</b>	203,53 ± 8,07	200	3,97	1,77
<b>CC5</b>	415,36 ± 41,09	400	9,89	3,84
<b>CC6</b>	820,15 ± 16,25	800	1,98	2,52
<b>CC7</b>	2.082,95 ± 161,63	2.000	7,76	4,15
<b>CC8</b>	5.274,31 ± 116,98	5.000	2,22	5,49
<b>CC9</b>	7.957,75 ± 366,90	8.000	5,61	-0,53
<b>CCLSQ</b>	9.363,12 ± 119,46	10.000	1,28	-6,30

CC: curva de calibração; DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; ER: erro relativo.

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 8** - Linearidade em amostras de DBS para o ATZ.

<b>Amostra</b>	<b>Conc. Experimental (ng/mL) Média (± DP)</b>	<b>Conc. Nominal (ng/mL)</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>EPR (%)</b>
<b>LIQ</b>	51,15 ± 1,15	50	2,27	2,30
<b>CC2</b>	100,94 ± 0,72	100	0,72	0,94
<b>CC3</b>	147,87 ± 3,45	150	2,33	-1,42
<b>CC4</b>	210,20 ± 10,43	200	4,97	5,10
<b>CC5</b>	387,23 ± 42,87	400	11,07	-3,19
<b>CC6</b>	761,03 ± 61,37	800	8,06	-4,87
<b>CC7</b>	1929,85 ± 78,16	2.000	4,06	-3,51
<b>CC8</b>	5234,74 ± 55,08	5.000	1,05	4,69
<b>CC9</b>	7940,21 ± 411,37	8.000	5,18	-0,75
<b>CCLSQ</b>	9725,63 ± 123,57	10.000	1,27	-2,74

CC: curva de calibração; DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; ER: erro relativo.

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 9** - Linearidade em amostras de DBS para o RAL.

<b>Amostra</b>	<b>Conc. Experimental (ng/mL) Média (<math>\pm</math> DP)</b>	<b>Conc. Nominal (ng/mL)</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>ER (%)</b>
<b>CCLIQ</b>	14,87 $\pm$ 0,56	15	3,77	-0,84
<b>CC2</b>	32,66 $\pm$ 0,93	30	2,87	8,86
<b>CC3</b>	55,80 $\pm$ 5,78	50	10,37	11,61
<b>CC4</b>	111,68 $\pm$ 2,66	100	2,39	11,68
<b>CC5</b>	162,18 $\pm$ 9,29	150	5,73	8,12
<b>CC6</b>	289,46 $\pm$ 32,67	300	11,29	-3,51
<b>CC7</b>	402,71 $\pm$ 25,48	400	6,33	0,68
<b>CC8</b>	632,67 $\pm$ 33,09	600	5,23	5,44
<b>CC9</b>	785,18 $\pm$ 35,18	800	4,48	-1,85
<b>CCLSQ</b>	930,74 $\pm$ 44,63	1.000	4,80	-6,93

CC: curva de calibração; DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; ER: erro relativo.

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 10** - Linearidade em amostras de DBS para o EFZ.

<b>Amostra</b>	<b>Conc. Experimental (ng/mL) Média (<math>\pm</math> DP)</b>	<b>Conc. Nominal (ng/mL)</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>ER (%)</b>
<b>CCLIQ</b>	47,997 $\pm$ 5,99	50	5,55	7,99
<b>CC2</b>	153,70 $\pm$ 7,99	150	5,20	2,47
<b>CC3</b>	201,29 $\pm$ 26,31	200	13,07	0,64
<b>CC4</b>	266,22 $\pm$ 9,58	300	3,60	-11,26
<b>CC5</b>	376,19 $\pm$ 37,23	400	9,60	0,58
<b>CC6</b>	500,29 $\pm$ 15,21	500	3,04	0,60
<b>CC7</b>	982,78 $\pm$ 72,58	1.000	7,39	-1,72
<b>CC8</b>	2.053,57 $\pm$ 26,11	2.000	1,27	2,68
<b>CC9</b>	4.049,97 $\pm$ 121,52	4.000	3,00	1,25
<b>CCLSQ</b>	4.798,54 $\pm$ 107, 51	5.000	2,24	-4,03

CC: curva de calibração; DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; ER: erro relativo.

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 11** - Linearidade em amostras de plasma para o RTV.

Amostra	Conc. Experimental (ng/mL) Média ( $\pm$ DP)	Conc. Nominal (ng/mL)	DPR (%)	ER (%)
CCLIQ	54,32 $\pm$ 0,69	50	1,27	8,65
CC2	107,88 $\pm$ 3,30	100	3,06	7,89
CC3	148,30 $\pm$ 11,01	150	7,43	-1,13
CC4	203,39 $\pm$ 15,70	200	7,72	1,69
CC5	419,72 $\pm$ 18,00	400	4,29	4,93
CC6	790,67 $\pm$ 35,62	800	4,51	-1,17
CC7	1.969,89 $\pm$ 210,13	2.000	10,67	-1,51
CC8	5.103,84 $\pm$ 125,74	5.000	2,46	2,08
CC9	7.895,27 $\pm$ 626,71	8.000	7,94	-1,30
CCLSQ	9.798,24 $\pm$ 369,81	10.000	3,77	2,02

CC: curva de calibração; DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; ER: erro relativo.

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 12** - Linearidade em amostras de plasma para o ATZ.

Amostra	Conc. Experimental (ng/mL) Média ( $\pm$ DP)	Conc. Nominal (ng/mL)	DPR (%)	ER (%)
CCLIQ	52,69 $\pm$ 2,57	50	4,88	5,37
CC2	91,18 $\pm$ 0,21	100	0,24	-8,82
CC3	145,99 $\pm$ 7,32	150	5,01	-2,67
CC4	217,74 $\pm$ 3,55	200	1,63	8,87
CC5	436,81 $\pm$ 4,61	400	1,06	9,20
CC6	700,43 $\pm$ 12,56	800	1,79	-12,45
CC7	1.956,65 $\pm$ 86,59	2.000	4,43	-2,17
CC8	5.478,78 $\pm$ 125,638	5.000	2,29	9,58
CC9	7.848,14 $\pm$ 553,625	8.000	7,05	-1,9
CCLSQ	9.275,06 $\pm$ 410,43	10.000	4,43	-7,25

CC: curva de calibração; DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; ER: erro relativo.

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 13** - Linearidade em amostras de plasma para o RAL.

<b>Amostra</b>	<b>Conc. Experimental (ng/mL) Média (<math>\pm</math> DP)</b>	<b>Conc. Nominal (ng/mL)</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>ER (%)</b>
<b>CCLIQ</b>	14,85 $\pm$ 0,40	15	2,71	-1,02
<b>CC2</b>	29,77 $\pm$ 1,89	30	6,35	-0,78
<b>CC3</b>	51,46 $\pm$ 0,37	50	0,72	2,92
<b>CC4</b>	94,60 $\pm$ 4,43	100	4,69	-5,4
<b>CC5</b>	159,58 $\pm$ 10,25	150	6,42	6,38
<b>CC6</b>	303,42 $\pm$ 15,75	300	5,19	1,14
<b>CC7</b>	406,26 $\pm$ 11,25	400	2,77	1,57
<b>CC8</b>	586,83 $\pm$ 13,65	600	2,33	-2,2
<b>CC9</b>	873,26 $\pm$ 21,36	800	2,45	9,16
<b>CCLSQ</b>	1.004,80 $\pm$ 26,72	1.000	2,66	0,48

CC: curva de calibração; DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; ER: erro relativo.

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 14** - Linearidade em amostras de plasma para o EFZ.

<b>Amostra</b>	<b>Conc. Experimental (ng/mL) Média (<math>\pm</math> DP)</b>	<b>Conc. Nominal (ng/mL)</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>ER (%)</b>
<b>CCLIQ</b>	55,23 $\pm$ 4,34	50	4,12	5,27
<b>CC2</b>	141,54 $\pm$ 9,23	150	6,53	-5,64
<b>CC3</b>	198,22 $\pm$ 9,24	200	4,66	-0,89
<b>CC4</b>	338,09 $\pm$ 32,04	300	9,48	12,70
<b>CC5</b>	433,29 $\pm$ 12,72	400	2,94	8,32
<b>CC6</b>	527,22 $\pm$ 26,63	500	5,05	5,44
<b>CC7</b>	1.033,17 $\pm$ 39,20	1.000	3,79	3,32
<b>CC8</b>	2.020,37 $\pm$ 106,45	2.000	5,27	1,02
<b>CC9</b>	3.970,04 $\pm$ 254,92	4.000	6,42	-0,75
<b>CCLSQ</b>	4.659,59 $\pm$ 172,06	5.000	3,69	-6,81

CC: curva de calibração; DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; ER: erro relativo.

Fonte: Autoria própria.

#### 5.3.4 PRECISÃO E EXATIDÃO

A precisão e exatidão inter e intracorrída em DBS e plasma foram determinadas analisando cinco réplicas de amostras de QC em quatro níveis de concentração. Os resultados demonstraram que os valores estavam dentro da faixa aceitável, DPR e ER  $\pm 20\%$  da concentração nominal para o LIQ e  $\pm 15\%$  para todos os outros níveis (Tabelas 15 e 16). O método foi então considerado preciso e exato para todos os analitos em ambas as matrizes.

**Tabela 15** - Precisão e exatidão inter e intracorrida da quantificação dos analitos em amostras de DBS.

Analito	CQ	Concentração Nominal (ng/mL)	Análise Intracorrida (n= 5)									Análise Intercorrida (n= 15)		
			Dia 1			Dia 2			Dia 3			Concentração Experimental (Média)	DPR (%)	ER (%)
			Concentração Experimental	DPR (%)	ER (%)	Concentração Experimental	DPR (%)	ER (%)	Concentração Experimental	DPR (%)	ER (%)			
RTV	LIQ	50	49,33	3,02	-1,34	52,17	4,84	4,34	51,06	6,75	2,12	50,85	2,30	1,70
	CQB	150	147,30	3,24	-1,80	156,62	5,28	4,41	131,97	2,25	-12,02	145,30	6,99	-3,13
	CQM	5.000	4.532,89	3,55	-9,34	5.029,76	8,56	0,59	5.049,00	6,08	0,98	4.870,55	4,90	-2,59
	CQA	8.500	8.062,47	9,29	-5,15	7.252,02	0,03	-14,68	8.989,94	6,75	5,76	8.101,48	8,76	-4,69
ATZ	LIQ	50	49,11	9,98	-1,78	54,69	6,94	9,38	43,41	1,32	-13,18	49,07	9,38	-1,86
	CQB	150	151,63	2,92	1,09	141,52	3,06	-5,65	152,30	3,25	1,53	148,48	3,32	-1,01
	CQM	5.000	4.623,35	3,71	-7,53	5.336,39	2,52	6,73	4.574,72	6,54	-8,51	4.844,82	7,19	-3,10
	CQA	8.500	8.804,73	2,80	3,58	7.525,39	2,23	-11,47	8.139,25	8,99	-4,24	8.156,46	6,41	-4,04
RAL	LIQ	15	15,38	3,45	2,53	15,04	9,68	0,27	16,00	4,01	6,67	15,47	2,58	3,13
	CQB	45	46,84	7,38	4,09	43,67	7,20	-2,95	44,28	9,75	-1,60	44,93	3,06	-0,15
	CQM	500	539,13	4,98	7,83	471,37	8,48	-5,73	510,03	10,44	2,01	506,84	5,48	1,37
	CQA	850	859,81	3,18	1,15	859,04	3,27	1,06	933,43	0,94	9,81	884,09	3,95	4,01
EFZ	LIQ	50	50,91	2,00	1,82	50,51	7,32	1,02	53,96	4,07	7,92	52,79	2,87	5,58
	CQB	300	331,72	1,56	10,57	309,67	7,36	3,22	266,64	4,44	-11,12	302,68	8,93	0,89
	CQM	2.500	2.415,50	7,49	-3,38	2.493,32	9,46	-0,27	2.596,25	2,44	3,85	2.501,69	2,96	0,07
	CQA	4.240	4.180,86	7,61	-1,39	4.498,39	4,51	6,09	4.260,95	11,53	0,49	4.313,40	3,13	1,73

DPR: desvio padrão relativo; ER: erro relativo.

Tabela 16 - Precisão e exatidão inter e intracorrida da quantificação dos analitos em amostras de plasma.

Analito	CQ	Concentração nominal (ng/mL)	Análise Intracorrida (n= 5)									Análise Intercorrida (n= 15)		
			Dia 1			Dia 2			Dia 3			Concentração Experimental (mean)	DPR (%)	ER (%)
			Concentração Experimental	DPR (%)	ER (%)	Concentração Experimental	DPR (%)	ER (%)	Concentração Experimental	DPR (%)	ER (%)			
RTV	LIQ	50	50,79	7,84	1,58	52,75	8,02	5,50	51,99	10,42	3,98	51,84	1,55	3,68
	CQB	150	148,15	3,84	-1,23	156,27	9,38	4,18	159,49	4,53	6,33	154,60	3,09	3,09
	CQM	5.000	4.846,35	1,66	-3,08	4.969,53	1,51	-0,61	5.398,46	4,71	7,97	5.071,45	4,67	1,43
	CQA	8.500	8.801,47	5,94	3,55	8.456,56	9,18	-0,51	9.453,57	3,42	11,22	8.903,87	4,64	4,75
ATZ	LIQ	50	45,26	4,51	-9,48	45,44	12,01	-9,12	45,97	12,10	-8,06	45,56	0,67	-8,88
	CQB	150	159,04	5,55	6,03	161,35	6,15	7,57	133,19	2,32	-11,21	151,19	8,44	0,79
	CQM	5.000	5.394,02	3,46	7,88	5.439,48	1,87	8,79	5.595,99	3,71	11,92	5.476,50	1,58	9,53
	CQA	8.500	8.448,29	5,70	-0,61	7.890,73	5,25	-7,17	9.433,82	3,61	10,99	8.590,95	7,43	1,07
RAL	LIQ	15	12,66	4,62	-15,6	16,06	11,35	7,07	14,94	5,68	-0,40	14,55	9,73	-3,00
	CQB	45	45,13	3,24	0,29	44,37	2,71	-1,40	43,59	4,87	-3,13	44,36	1,42	-1,42
	CQM	500	531,34	4,22	6,27	537,76	5,53	7,55	516,14	7,23	3,23	528,41	1,72	5,68
	CQA	850	812,25	4,78	-4,44	797,32	3,05	-6,20	815,46	6,82	-4,06	808,34	0,98	-4,90
EFZ	LIQ	50	51,80	7,75	3,6	50,02	9,25	0,04	45,18	12,96	-9,64	49,00	2,83	-2,00
	CQB	300	287,56	1,67	-4,15	310,07	6,53	3,36	316,16	9,93	5,39	304,60	4,04	1,53
	CQM	2.500	2.552,71	3,97	2,11	2.438,43	9,56	-2,46	2.625,15	8,82	5,01	2.538,76	3,03	1,55
	CQA	4.240	4.113,52	2,35	-2,98	3.833,74	3,86	-9,58	3.825,77	4,65	-9,77	3.924,34	3,41	-7,44

DPR: desvio padrão relativo; ER: erro relativo.

### 5.3.5 EFEITO MATRIZ, RECUPERAÇÃO E EFICIÊNCIA DO PROCESSO

Os parâmetros de efeito matriz, recuperação e eficiência do processo foram determinados em um único experimento através da comparação dos resultados provenientes de amostras extraídas em quatro concentrações (LIQ, CQB, CQM e CQA) para cada analito em ambas as matrizes com as concentrações nominais (Tabelas 17 e 18).

**Tabela 17** - Efeito matriz (EM), recuperação (REC) e eficiência do processo (EP) para os analitos em amostras de DBS.

<b>Analito</b>	<b>CQ</b>	<b>EM (Média %)</b> <b>(n= 5)</b>	<b>REC (Média %)</b> <b>(n= 5)</b>	<b>EP (Média %)</b> <b>(n= 5)</b>
RTV	CQB	98,83	75,11	79,21
	CQM	104,89	71,85	75,36
	CQA	103,95	69,11	71,84
	<b>Média (DPR %)</b>	102,55 (3,18)	72,02 (4,17)	75,47 (4,88)
ATZ	CQB	98,83	80,11	79,18
	CQM	107,88	82,01	88,47
	CQA	116,99	78,32	91,63
	<b>Média (DPR %)</b>	107,90 (8,41)	80,15 (2,30)	86,43 (7,48)
RAL	CQB	116,72	66,87	78,06
	CQM	122,06	59,53	72,67
	CQA	124,85	65,18	81,38
	<b>Média (DPR %)</b>	121,21 (3,41)	63,86 (6,02)	77,37 (5,68)
EFZ	CQB	80,36	73,62	59,16
	CQM	90,78	64,13	58,22
	CQA	94,79	65,81	62,39
	<b>Média (DPR %)</b>	88,64 (8,40)	67,85 (7,46)	59,92 (3,65)

DPR: desvio padrão relativo.

**Tabela 18** - Efeito matriz (EM), recuperação (REC) e eficiência do processo (EP) para os analitos em amostras de plasma.

<b>Analito</b>	<b>CQ</b>	<b>EM (Média %)</b> <b>(n= 5)</b>	<b>REC (Média %)</b> <b>(n= 5)</b>	<b>EP (Média %)</b> <b>(n= 5)</b>
RTV	CQB	85,75	86,40	74,09
	CQM	106,48	90,97	96,86
	CQA	105,87	90,51	95,82
	<b>Média (DPR %)</b>	99,37 (11,87)	89,29 (2,81)	88,92 (14,46)
ATZ	CQB	83,46	87,72	83,22
	CQM	103,15	89,56	92,38
	CQA	102,84	101,79	104,68
	<b>Média (DPR %)</b>	96,48 (11,69)	93,02 (8,22)	93,43 (11,53)
RAL	CQB	102,24	91,18	93,23
	CQM	108,01	104,41	112,77
	CQA	107,56	100,39	107,98
	<b>Média (DPR %)</b>	105,94 (3,03)	98,66 (6,87)	104,66 (9,73)
EFZ	CQB	81,04	90,72	73,52
	CQM	96,81	95,69	92,64
	CQA	95,12	93,94	89,36
	<b>Média (DPR %)</b>	90,99 (9,52)	93,45 (2,69)	85,17 (12,01)

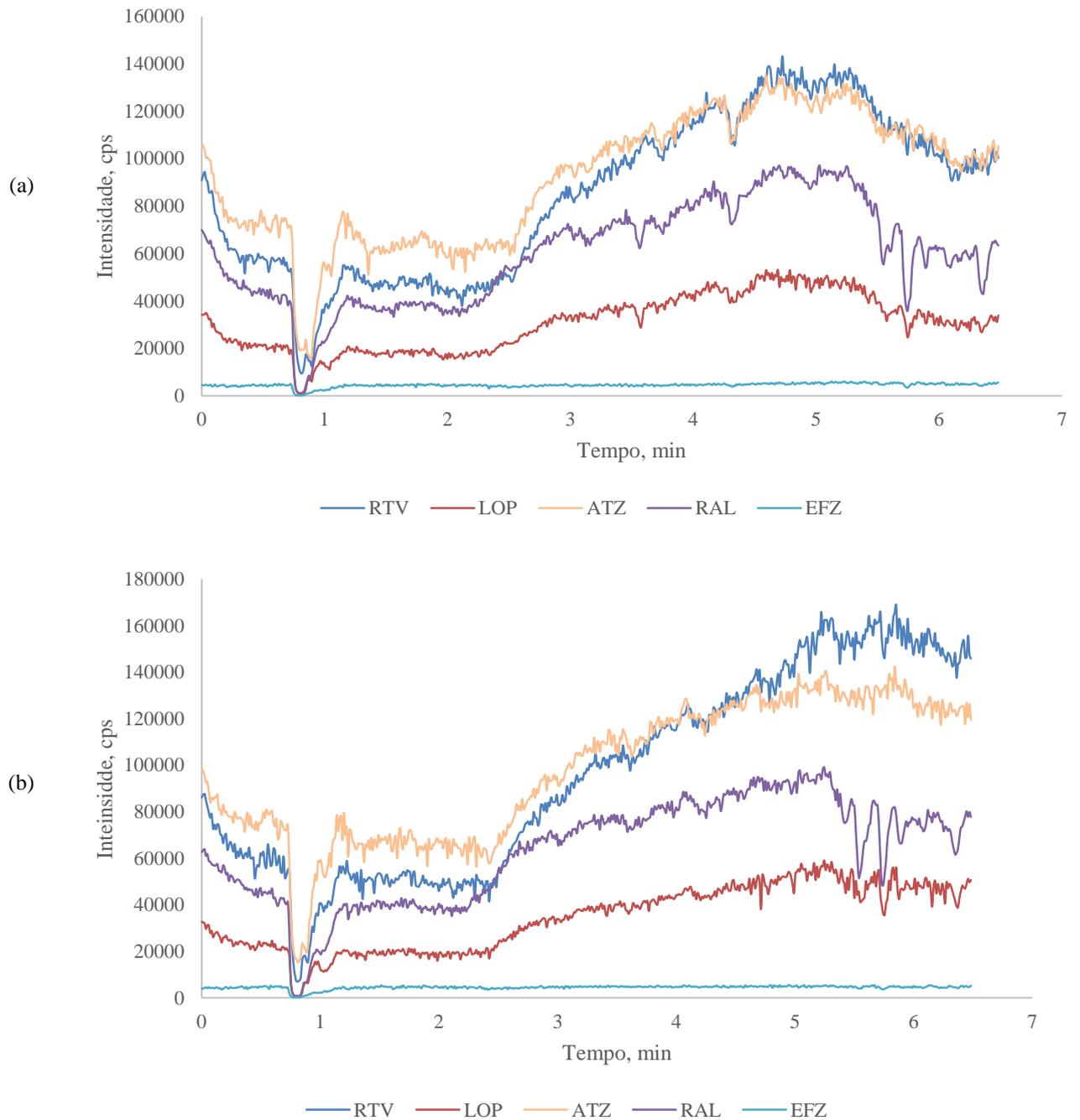
DPR: desvio padrão relativo.

Segundo o FDA, a recuperação do analito não precisa ser de 100%, mas sua extensão deve ser consistente (FDA, 2018). Os resultados de recuperação e de eficiência do processo foram superiores a 60% e 88%, respectivamente, para ambas as matrizes. Os dados foram consistentes no decorrer das faixas de concentração testadas, com desvio de  $\pm 15\%$  em todos os níveis, conforme mostrado nas Tabelas 17 e 18.

Através da avaliação qualitativa do efeito da matriz, observou-se ausência de interferência significativa de componentes da matriz nos tempos de retenção dos analitos e PI, conforme demonstrado na Figura 7. No entanto, é possível observar acentuada supressão da ionização no tempo de 1,5 min. É possível notar ainda um incremento na ionização de todos os fármacos a partir de 3 min, evento este atribuído às alterações na fase móvel durante o gradiente. Tal possibilidade foi confirmada através da injeção de metanol puro concomitante

à infusão direta dos analitos no espectrômetro de massas, o que mostrou o mesmo perfil encontrado na amostra branco de matriz.

**Figura 7** - Cromatogramas obtidos na avaliação qualitativa do efeito matriz em amostras de DBS (a) e plasma (b).



Fonte: Autoria própria.

O FMN foi calculado em duas concentrações (CQB e CQA) para todos os analitos em ambas as matrizes, conforme resumido na Tabela 19. Os valores de FMN apresentaram DPR

de  $\pm 15\%$  nos níveis testados conforme recomendado na RDC N° 27/2012 da ANVISA, demonstrando assim que o método de extração desenvolvido foi apropriado para ambas as matrizes.

**Tabela 19** - Fator de Matriz Normalizado (FMN) para os analitos em amostras de DBS e plasma.

Analito	CQ	DBS	Plasma
		FMN (DPR %) (n= 5)	FMN (DPR %) (n= 5)
RTV	CQB	0,98 (5,15)	1,43 (8,45)
	CQA	1,16 (6,17)	1,02 (5,39)
ATZ	CQB	1,24 (8,83)	1,51 (2,80)
	CQA	1,30 (5,48)	0,99 (3,75)
RAL	CQB	1,46 (5,51)	1,50 (6,48)
	CQA	1,38 (6,79)	1,03 (3,24)
EFZ	CQB	1,01 (9,02)	1,01 (9,06)
	CQA	1,05 (10,01)	0,91 (6,83)

DPR: desvio padrão relativo.

### 5.3.6 ESTABILIDADE

Os analitos em solução estoque não apresentaram decaimento significativo quando armazenados em freezer à  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 7 (ER%: - 1,68 a 3,15) ou 30 dias (ER%: -3,45 a 5,36). Desta forma, nas análises de rotina as soluções estoque foram armazenadas por até 30 dias a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso na preparação das soluções de trabalho.

Para os analitos em amostras de plasma, não houve decaimento significativo (ER:  $\leq 15\%$ ), demonstrando assim sua estabilidade após 6 h no amostrador automático a  $5^{\circ}\text{C}$  e após 7 dias a  $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$  (Tabela 20). A estabilidade após ciclos de congelamento-descongelamento não foi determinada, uma vez que, apenas plasma fresco ou refrigerado foi usado no estudo com o intuito de permitir a comparação com os analitos em DBS.

Para os analitos em DBS (Tabela 21), não foi observado decaimento significativo de RAL, RTV, ATZ, EFV quando as amostras foram mantidas na bancada ou dentro do amostrador automático (ER:  $\leq 15\%$ ), corroborando com dados previamente demonstrados por Heine e colaboradores (2008; 2011) em estudos com vários antirretrovirais em DBS. As estabilidades de RAL, RTV e ATZ também foram satisfatórias após 7 dias a  $23^{\circ}\text{C}$  ou  $40^{\circ}\text{C}$ . Contudo, nestas condições, foi verificada degradação significativa para o EFV (ER: -23,30 a - 18,74%). Portanto, os procedimentos de extração, bem como as análises cromatográficas de

todas as amostras, foram realizados em até 24 horas após a coleta para garantir a estabilidade do EFZ.

**Tabela 20** - Estabilidade dos analitos em amostras de plasma.

Analito	CQ	Conc. nominal (ng/mL)	Amostrador automático			Armazenamento durante 24h (2-8°C)			Armazenamento durante 7 dias (2-8°C)		
			Con. Exp. (Média ± DP)	DPR (%)	ER (%)	Con. Exp. (Média ± DP)	DPR (%)	ER (%)	Con. Exp. (Média ± DP)	DPR (%)	ER (%)
RTV	CQB	150	161,96 ± 2,93	1,81	7,97	168,78 ± 1,66	0,98	12,52	164,49 ± 5,19	3,16	9,66
	CQA	8.500	8.700,12 ± 80,49	0,92	2,35	8.699,27 ± 147,84	1,69	2,34	7.527,01 ± 188,34	2,50	-11,45
ATZ	CQB	150	146,22 ± 3,67	2,51	-	144,52 ± 3,40	2,35	-3,65	140,39 ± 5,87	4,18	-6,41
	CQA	8.500	8.719,08 ± 252,11	2,89	2,58	8.329,17 ± 209,00	2,51	-2,01	8.386,15 ± 305,28	3,64	-1,34
RAL	CQB	45	47,07 ± 1,94	4,13	4,60	44,42 ± 1,33	2,99	-1,29	47,94 ± 0,59	1,24	6,53
	CQA	850	847,45 ± 32,29	3,81	-	832,57 ± 10,23	1,23	-2,05	863,97 ± 17,43	2,02	1,64
EFZ	CQB	300	329,54 ± 7,51	2,28	9,85	307,27 ± 12,27	3,99	2,42	326,72 ± 13,92	4,26	8,91
	CQA	4.240	4.320,14 ± 108,57	2,51	1,89	4.392,09 ± 64,41	1,47	3,59	4.473,86 ± 67,96	1,52	5,52

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; ER: erro relativo.

**Tabela 21** - Estabilidade dos analitos em amostras de DBS.

Analito	CQ	Conc. nominal (ng/mL)	Bancada			Amostrador automático			Armazenamento durante 24h (23 ± 1°C)			Armazenamento durante 7 dias (23 ± 1°C)			Armazenamento durante 7 dias (40 ± 1°C)		
			Con. Exp. (Média ± DP)	DPR (%)	ER (%)	Con. Exp. (Média ± DP)	DPR (%)	ER (%)	Con. Exp. (Média ± DP)	DPR (%)	ER (%)	Con. Exp. (Média ± DP)	DPR (%)	ER (%)	Con. Exp. (Média ± DP)	DPR (%)	ER (%)
RTV	CQB	150	146,65 ± 4,33	2,95	-2,23	169,78 ± 6,33	3,73	13,19	142,51 ± 5,74	4,03	-4,99	128,72 ± 6,80	5,28	-14,19	133,02 ± 2,79	2,10	-11,32
	CQA	8.500	8.904,83 ± 200,58	2,25	4,75	8.730,83 ± 326,05	3,73	2,71	8.637,38 ± 282,91	3,27	1,62	8.511,96 ± 252,43	2,96	0,14	8.715,82 ± 280,16	3,21	2,54
ATZ	CQB	150	147,68 ± 3,05	2,07	-1,55	152,13 ± 3,09	2,03	1,42	155,43 ± 6,33	4,07	3,62	139,07 ± 7,66	5,51	-7,29	129,77 ± 12,51	9,64	-13,49
	CQA	8.500	8.680,31 ± 189,27	2,18	2,12	8.721,06 ± 205,22	2,35	2,60	8.430,66 ± 178,84	2,12	-0,82	7.299,12 ± 239,15	3,28	-14,13	7.807,36 ± 325,39	4,17	-8,15
RAL	CQB	45	49,87 ± 0,94	1,88	10,82	50,01 ± 2,79	5,58	11,13	44,22 ± 2,07	4,68	-1,73	47,94 ± 0,59	1,24	6,53	39,07 ± 1,10	2,81	-13,78
	CQA	850	852,47 ± 17,89	2,09	0,29	846,15 ± 22,72	2,69	-0,45	846,97 ± 11,98	1,41	-0,36	863,97 ± 17,44	2,02	1,64	828,12 ± 19,96	2,41	-2,57
EFZ	CQB	300	323,93 ± 3,22	0,99	7,98	314,88 ± 21,56	6,84	4,96	284,56 ± 14,73	5,18	-5,15	249,33 ± 10,25	4,11	-16,89	232,86 ± 2,20	0,81	-22,38
	CQA	4.240	4.281,92 ± 80,79	1,89	0,99	4.306,80 ± 92,55	2,15	1,57	4.260,53 ± 100,12	2,35	0,48	3.252,02 ± 68,07	2,09	-23,30	3.445,34 ± 130,11	3,78	-18,74

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; ER: erro relativo.

Os dados de estabilidade do EFZ em DBS após 7 dias encontrados divergem de estudos semelhantes disponíveis na literatura. Em um estudo realizado por Duthaler e colaboradores (2018), as concentrações do EFZ em DBS foram estáveis durante 4 semanas a 40°C e 75% de umidade relativa. Segundo Kromdijk e colaboradores (2012), as concentrações de EFZ em DBS foram estáveis por pelo menos 7 meses quando armazenadas em ambiente temperatura em um saco de alumínio com um pacote dessecante. Em ambos os estudos citados, o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), ao invés da heparina, foi o anticoagulante utilizado para a coleta de sangue venoso. Embora, em estudo realizado por Kumar e colaboradores (2007), as concentrações plasmáticas de EFV tenham variado < 10% em amostras de sangue coletadas de forma pareada com heparina ou EDTA, esta variação foi atribuída pelos autores a uma variabilidade interindividual observada nas concentrações de EFZ e não foi estabelecida uma relação negativa sobre o uso de heparina na determinação de concentrações de EFZ. Além disso, a estabilidade de analitos em DBS também pode ser afetada por outros parâmetros, como umidade e exposição à luz, que são de maior complexidade de reprodução em outros laboratórios (CAPIAU et al., 2019).

A aplicação clínica do método desenvolvido foi realizada considerando estes resultados de estabilidade. No entanto, para maior aplicabilidade do método, novas investigações devem ser realizadas para obter mais informações sobre a estabilidade de longo prazo dos analitos e outros fatores que podem afetá-la.

### 5.3.7 PARAMETROS ESPECÍFICOS DE VALIDAÇÃO APLICADOS A DBS

Para validação adequada de métodos bioanalíticos aplicados a amostras de DBS, parâmetros adicionais devem ser investigados, como os efeitos do volume, do HCT e da homogeneidade. A avaliação do efeito da homogeneidade em DBS (*volcano effect*), no entanto, apenas mostra utilidade em casos de análise parcial do DBS, ou seja, quando há recorte de áreas delimitadas no DBS, avaliando assim se os resultados de áreas centrais são equivalentes às descentralizadas (CAPIAU et al., 2019). Para o método desenvolvido neste estudo, foi utilizada a “mancha de sangue seco” na íntegra, portanto não houve necessidade de avaliar o *volcano effect*.

O efeito do HCT (20%, 30% e 60%) na exatidão dos CQ (CQB e CQA) variou entre 85 % e 115% para todos os analitos, ou seja, dentro do critério de variação aceitável de 15%. Além disso, nenhuma diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) foi observada entre os níveis de HCT testados. Apesar de o HCT ser um conhecido e importante ponto de falha associado a abordagem de DBS, a estratégia de análise do DBS inteiro, como conduzido neste estudo, já

está relatada na literatura como uma das alternativas possíveis para superar este problema (DE KESEL et al., 2014; KOK; FILLET, 2017).

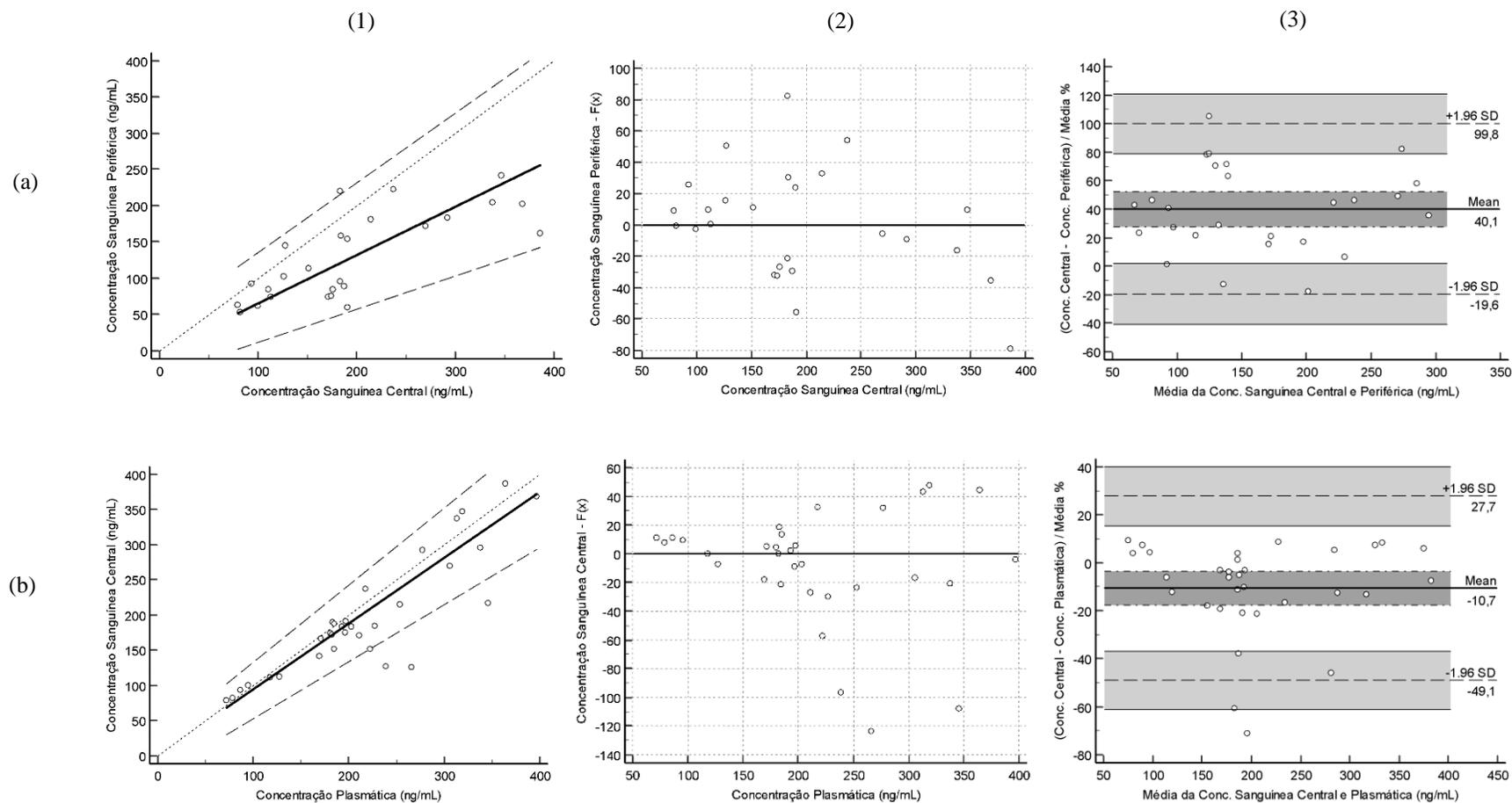
Sobre a avaliação do efeito do volume gotejado, quando os volumes de sangue total de 20  $\mu\text{L}$  e 30  $\mu\text{L}$  foram transferidos para os cartões e analisados, as concentrações experimentais dos analitos foram inferiores a 85% dos níveis nominais, demonstrando assim um impacto negativo na exatidão. Por outro lado, quando o volume foi aumentado para 55  $\mu\text{L}$ , todas as concentrações experimentais dos analitos variaram  $\pm 15\%$  de seus níveis nominais. Tais resultados podem ser justificados pelo fato de que em uma análise da totalidade da área demarcada no cartão de coleta, como realizada neste estudo, diferentes volumes gotejados geram diferentes quantidades de analito na área, diferente do que seria observado em uma análise usando recorte parcial do DBS.

#### 5.4 Validação clínica

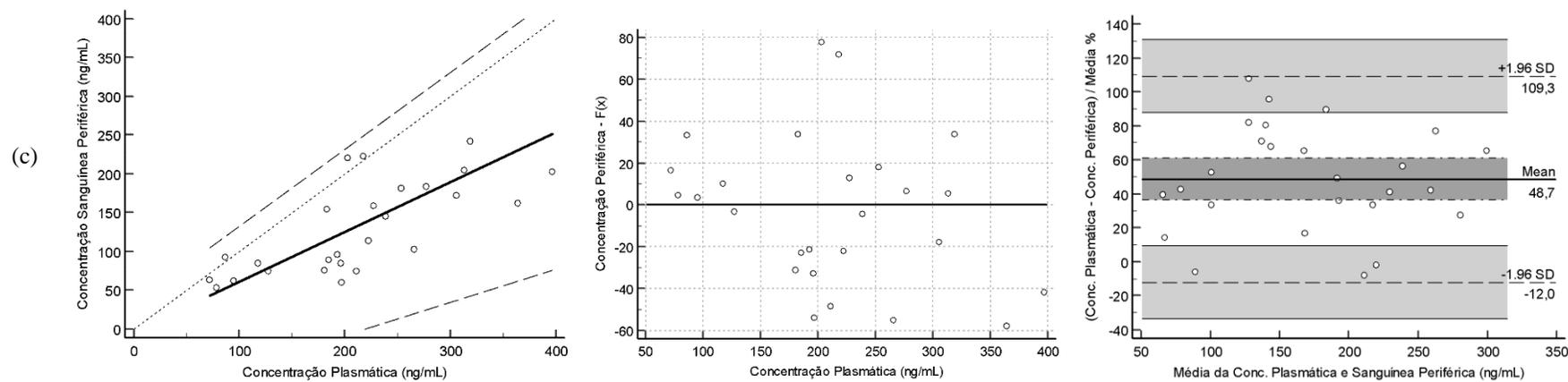
As concentrações plasmáticas de EFZ estavam na faixa de 65,42 - 396,95 ng/mL, as concentrações em DBS centrais e periféricas variaram entre 48,65 - 368,38 ng/mL e 52,82 - 242,05 ng/mL, respectivamente. Dez amostras periféricas de DBS foram excluídas do estudo devido ao baixo volume coletado. A análise de regressão de Passing-Bablok (Figura 8, item 1) mostrou uma relação significativa entre as concentrações de EFZ quantificadas em DBS periférico e DBS central (IC 95%: inclinação= -1,2474, intercepto= 0,667), entre DBS periférico e plasma (IC 95%: inclinação= -3,300, interceptação= 0,6433), e também entre DBS central e plasma (IC 95%: inclinação = 0,9364, interceptação = 0,689). Em todas as avaliações, foi aplicado o teste de Cusum para linearidade que revelou a ausência de desvio significativo da linearidade ( $P > 0,05$ ) e nenhum viés constante ou proporcional foi detectado. A distribuição dos resíduos foi aleatória em todas as avaliações, exceto na avaliação entre as concentrações de EFZ em DBS central e plasma (Figura 8, item 2, letra b), possivelmente em decorrência de resultado *outlier*.

A análise de regressão de Passing-Bablok pode ser complementada com o gráfico de Bland-Altman (Figura 8, item 3), onde é possível observar que todos os dados se encontram dentro dos limites de concordância ( $\pm 1,96$  SD), com 95% de intervalo confiança. A avaliação pareada para cada grupo foi considerada concordante, sugerindo assim que as estratégias para quantificação de EFZ nas matrizes testadas podem ser intercambiáveis entre si.

**Figura 8** - Análise de regressão de Passing-Bablock (1), respectivo gráfico de resíduos (2), e gráfico de Bland-Altman (3) das concentrações medidas em: (a) DBS central e periférico, (b) DBS central e plasma, (c) DBS periférico e plasma.



**Figura 9** - Análise de regressão de Passing-Bablok (1), respectivo gráfico de resíduos (2), e gráfico de Bland-Altman (3) das concentrações medidas em: (a) DBS central e periférico, (b) DBS central e plasma, (c) DBS periférico e plasma.



Fonte: Autoria própria.

## 5.5 Modelagem Farmacocinética Populacional e Monitorização Terapêutica

Para a construção de um modelo de popPK para o EFZ e estudo de MTF, dados clínicos, antropométricos, de estilo de vida foram reunidos (Tabela 22) e amostras biológicas foram coletadas de sete pacientes grávidas infectadas pelo HIV-1 em tratamento com EFZ.

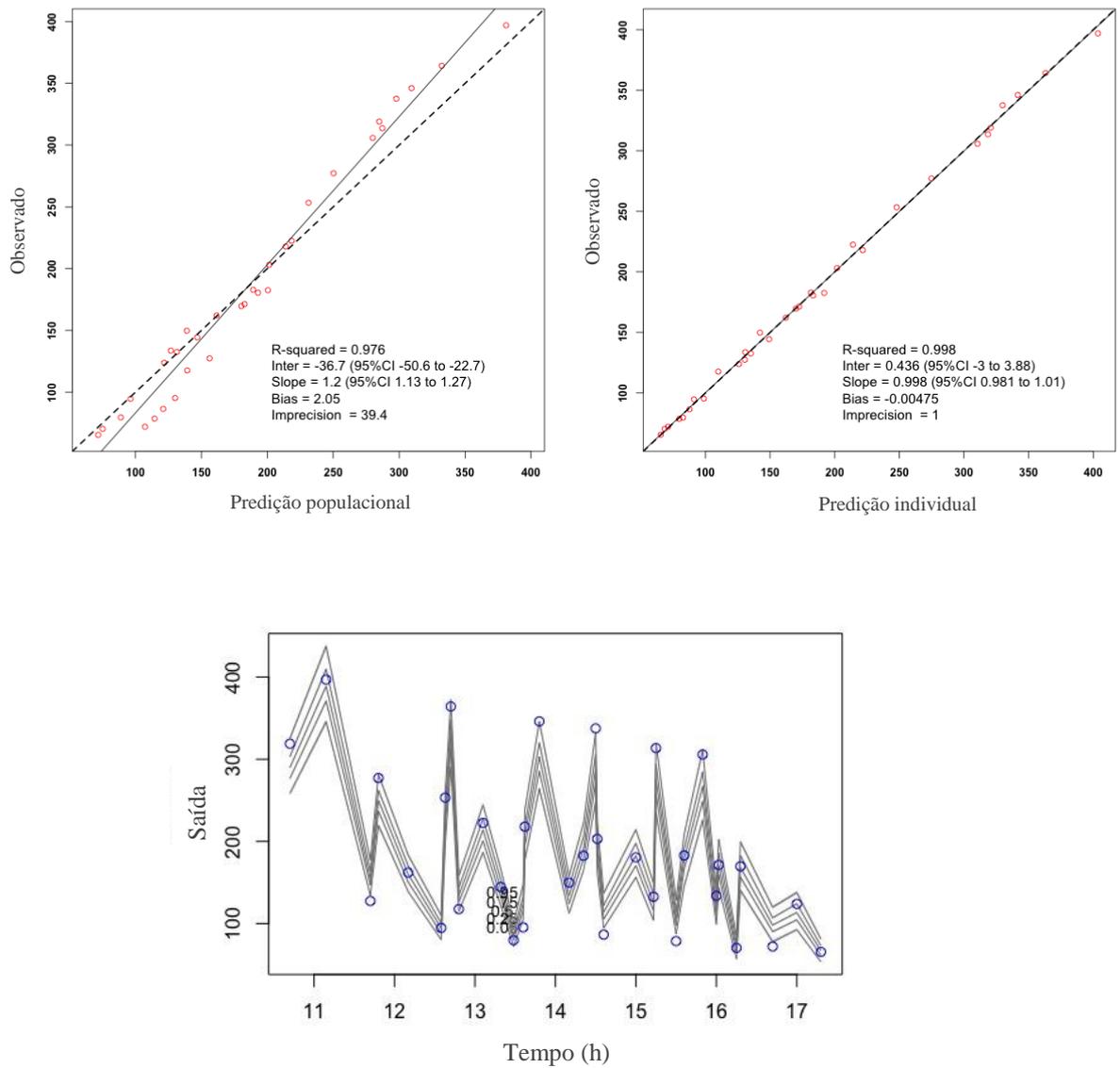
**Tabela 22** - Descrição das características demográficas e clínicas das participantes incluídas nos estudos de modelagem farmacocinética populacional e de monitorização terapêutica do EFZ.

Características	G 01	G 02	G 03	G 04	G 05	G 06	G 07
Idade materna (anos)	19	25	28	20	22	23	21
Idade Gestacional (semanas)	32	16	28	34	32	23	24
Peso (Kg)	72	60	69	62	74,7	56	65
Raça	Preta	Preta	Preta	Preta	Preta	Parda	Preta
Uso de cigarro no último mês	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
Uso de bebida alcoólica no último mês	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim
Uso de outros medicamentos	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Carga Viral (cópias/mL)	ND	ND	2083	1395	375	ND	1705
Contagem de TCD <sub>4</sub> <sup>+</sup> (célis/mm <sup>3</sup> )	370,3	764,8	943,1	350,0	398,0	324,0	270,9
Concentração plasmática (ng/mL) de EFZ 16 h							
pós-dose 600 mg	169,67	192,85	305,78	182,85	72,04	123,85	65,42

G: gestante; ND: não detectado.

Um modelo de dois compartimentos com absorção de primeira ordem, eliminação linear do compartimento central, volume de distribuição central (V) e periférico (V<sub>p</sub>), depuração intercompartimental (Q), constante de taxa de absorção (K<sub>a</sub>) fixada como 0,471 mostrou-se melhor em comparação com um modelo de um único compartimento ( $\Delta -2*LL$ : -46,9;  $\Delta AIC$ : -49,4). A inclusão dos parâmetros de contagem de células TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> na depuração e idade gestacional em V<sub>p</sub> ( $\Delta -2*LL$ : -17,5;  $\Delta AIC$ : -63,8) apresentou uma redução significativa da razão de verossimilhança e melhora no ajuste do modelo conforme mostrado por gráficos de qualidade de ajuste. Os gráficos de diagnóstico são apresentados na Figura 9.

**Figura 10** - Gráficos de diagnóstico das concentrações de EFZ observadas *versus* previstas por indivíduo (esquerda) e para a população (direita) e Verificação de Predição Visual (abaixo).



Fonte: Autoria própria.

O modelo final foi dado pelas seguintes equações: Depuração do EFZ (DP) = VTDP \* (30,4/ TCD<sub>4</sub><sup>+</sup>) e V<sub>p</sub> = VTV<sub>p</sub> \* (27,5/IG). Onde VT representa o valor típico de depuração e volume de distribuição periférico, respectivamente, e IG é a idade gestacional. As estimativas de parâmetros são fornecidas na Tabela 23.

**Tabela 23** - Estimativas dos parâmetros farmacocinéticos de EFZ para o modelo final.

Parâmetros farmacocinéticos	Média (DP)	%CV	Mediana
DP (L/h)	23,58 (0,50)	2,12	23,46
V (L)	25,58 (12,70)	49,64	24,16
Ka (h <sup>-1</sup> )	0,471	-	Fixo
FA	0,65 (0,009)	1,39	0,65
Q	7,40 (1,49)	20,17	7,66
Vp (L)	146,66 (49,17)	33,53	170,24

DP: depuração relativa; V: volume de distribuição relativo do compartimento central; Ka: constante de taxa de absorção; Q: depuração intercompartimental; Vp: volume de distribuição periférico; DP: desvio padrão; CV, coeficiente de variação.

As concentrações plasmáticas de EFZ determinadas durante a validação clínica (Seção 5.4) no intervalo de 10 a 16 h após administração de uma dose de 600 mg, estavam na faixa de 65,42 - 396,95 ng/mL. Estes achados mostram valores inferiores aos esperados durante o estado de equilíbrio (*steady state*) e, até mesmo, para a concentração mínima ( $C_{\min}$  ou  $C_{24h} = 1 \mu\text{g/mL}$ ) para adultos, segundo dados da literatura (MARZOLINI et al., 2001).

Estudos farmacocinético conduzidos por Dooley et al. (2015) e Cressey et al. (2012) em gestantes no terceiro trimestre em uso de EFZ (600 mg/dia) revelaram valores médios de  $C_{\min}$  de 1,35  $\mu\text{g/mL}$  e 1,6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Os autores também observaram aumento dos valores de  $C_{\min}$  no pós-parto e puerpério para 2,0  $\mu\text{g/mL}$ . Lartey e colaboradores (2020) avaliaram as concentrações de EFZ (600 mg) em associação com TDF/3TC (300 mg/300 mg) e os valores médios obtidos foram semelhantes aos dos estudos já mencionados ( $C_{\min} = 1,12 \mu\text{g/mL}$ ). Em função dessas divergências, também não foi possível correlacionar os parâmetros farmacocinéticos determinados pelo modelo desenvolvido com os disponíveis em trabalhos similares.

Os valores de concentração determinados em quaisquer das matrizes analisadas no presente estudo mostraram-se muito abaixo dos valores disponíveis na literatura pesquisada. Esta observação não pôde ser explicada por um fator único, mas sim por uma combinação de potenciais fatores que seriam de difícil determinação neste estudo, como, por exemplo, a qualidade/origem do IFA utilizado nos medicamentos e sua consequente biodisponibilidade aliada a um possível perfil farmacocinético particular encontrado na população brasileira.

Na avaliação dos marcadores farmacodinâmicos de eficácia da TARV (Tabela 22), as participantes 1, 4, 5, 6 e 7 apresentaram contagem de células TCD4<sup>+</sup> fora do intervalo normal

(477,5 – 1140,8 céls/mm<sup>3</sup>, para indivíduos acima de 18 anos), revelando considerável grau de imunossupressão, porém sem alcançar os níveis críticos, < 200 céls/mm<sup>3</sup> (BRASIL, 2019). Foi possível ainda a detecção de carga viral acima de 50 cópias/mL nas participantes 3, 4, 5 e 7, sendo que as participantes 3, 4 e 7 apresentaram valores superiores a 1000 cópias/mL, condição onde a cesárea eletiva a partir da 38<sup>a</sup> semana de gestação, com uso prévio de AZT injetável, é indicada para diminuir o risco de TV do HIV (BRASIL, 2019).

Não foi possível estabelecer uma correlação direta entre os achados farmacodinâmicos e a concentração de EFZ nas participantes para que inferências pudessem ser propostas, uma vez que, as concentrações estavam abaixo das concentrações terapêuticas em todas as participantes. No entanto, para a participante 2, que apresentava a menor idade gestacional (16 semanas), os objetivos terapêuticos da TARV parecem ter sido alcançados, possivelmente graças ao efeito proveniente dos demais fármacos que constituíam a terapia.

Um fator que merece destaque é a combinação de uso de bebida alcoólica e cigarro na participante 7, que apresentou importante grau de imunossupressão e carga viral > 1000 cópias/mL. O efeito negativo do álcool (MCCANCE-KATZNA et al., 2013) e da nicotina (FELDMAN et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2020) na eficácia da TARV já está demonstrado na literatura científica.

Para aplicação ideal da ferramenta de MTF, faz-se necessária a interpretação adequada dos achados junto à equipe multiprofissional a fim de embasar a tomada de decisões que possibilite alcançar a eficácia da TARV e evitar assim a TV. A possibilidade de alteração de regime terapêutico, de proposição de maiores investigações sobre adesão e disponibilização de orientações gerais às pacientes sobre comportamentos e hábitos podem ser discutidas e aplicadas a fim de buscar melhores resultados. Apesar dos resultados promissores sobre a aplicabilidade do método bioanalítico para fins de MTF do EFV, estudos adicionais em uma amostra maior mostram-se necessários para melhor esclarecimento do cenário PK/PD e embasamento de condutas terapêuticas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um método bioanalítico para a determinação de efavirenz, raltegravir, atazanavir, ritonavir em *dried blood spot* e plasma usando LC-MS/MS foi desenvolvido e validado. Os fármacos raltegravir, atazanavir, ritonavir foram estáveis em DBS por até sete dias a 40°C e 23°C, e o efavirenz foi estável por até 24 horas a 40°C e 23°C, indicando a possibilidade de transporte em condições controladas.

A validação clínica do efavirenz mostrou que as concentrações medidas em DBS periférico, DBS central e as concentrações plasmáticas são concordantes e podem ser intercambiáveis entre si. Os analitos foram quantificados com precisão e exatidão em DBS e representam uma alternativa interessante para a disseminação da individualização de dose no contexto da MTF, porém a validação clínica para raltegravir, atazanavir, ritonavir também deve ser realizada para aplicação segura do método.

Um modelo de dois compartimentos com absorção de primeira ordem, eliminação linear do compartimento central, volume de distribuição central e periférico, depuração intercompartimental e constante de taxa de absorção fixada como 0,471 para o efavirenz foi proposto de acordo com dados de farmacocinética populacional. Os valores de concentração determinados nas amostras para fins de MTF coletadas em gestantes em uso de efavirenz, em quaisquer das matrizes analisadas, mostraram-se fora do intervalo terapêutico disponível na literatura e com registros de ineficácia da TARV para a maioria das participantes, fato este que aponta para a necessidade de maiores investigações nesta população para melhor esclarecimento do cenário PK/PD e embasamento de condutas terapêuticas.

## REFERÊNCIAS

- ABBASSI-GHANA VATI, M.; GREER, L. G.; CUNNINGHAM, F. G. Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. **Obstet Gynecol**, v. 114, p. 1326–31, 2009.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **RDC nº 27 de 17 de maio de 2012**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, Brasil. 2012. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027\\_17\\_05\\_2012.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html). Acesso em 18 de fevereiro de 2022.
- ANDERSON, P. L. et al. Atazanavir pharmacokinetics in genetically determined CYP3A5 expressors versus non-expressors. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 1071–1079, 2009.
- ANTUNES, M.V. CHARÃO, M.F. LINDEN, R. Dried blood spots analysis with mass spectrometry: Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring. **Clinical Biochemistry** v. 49, n. 13-14, p.1035–1046, set. 2016.
- ARAB-ALAMEDDINE, M., et al. **Population pharmacokinetics of raltegravir in HIV positive and healthy subjects**. Oral abstr. at Twelfth Int. Work-shop Clin. Pharmacol. HIV Ther., Miami, FL. Abr. 2011.
- BACK, D. et al. Therapeutic drug monitoring in HIV infection: current status and future directions. **AIDS**, v. 16, sup. 1, p. S5–37, 2002.
- BARONCELLI, S. et al. Trough Concentrations of Lopinavir, Nelfinavir, and Nevirapine With Standard Dosing in Human Immunodeficiency Virus–Infected Pregnant Women Receiving 3-Drug Combination Regimens. **Ther Drug Monit.**, v. 30, p. 604–610, 2008.
- BARRE-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868–871, mai. 1983.
- BARRÉ-SINOUSSE, F.; ROSS, A. L.; DELFRAISSY, J. Past, present and future: 30 years of HIV research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 877-883, dez. 2013.
- BAZZOLI, C. et al. Intracellular Pharmacokinetics of Antiretroviral Drugs in HIV-Infected Patients, and their Correlation with Drug Action. **Clin Pharmacokinet.**, v. 49, n. 1, p. 17-45, 2010.
- BEDOR, D. C. G. et al. Dried Blood Spot Technique-Based Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method as a Simple Alternative for Benznidazole Pharmacokinetic Assessment. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 62, n. 12, 2018.
- BETHUNE, M. P. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: A review of the last 20 years (1989.2009). **Antiviral Research**, v.85, n. 1, p.75–90, jan. 2010.
- BHATTI, A. B.; USMAN, M.; KANDI, V. Current Scenario of HIV/AIDS, Treatment Options, and Major Challenges with Compliance to Antiretroviral Therapy. **Cureus**, v. 8, n. 3, p. 1-12, jan. 2016.

BISHOP, J. D. et al. CD4 Count Recovery After Antiretroviral Therapy Initiation in Patients Infected with the Human Immunodeficiency Virus. **Am J MedSci**, 2016.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Measuring agreement in method comparison studies. **Statistical Methods in Medical Research**, v. 8, p. 135-160, 1999.

BOFFITO, M. et al. Current status and future prospects of therapeutic drug monitoring and applied clinical pharmacology in antiretroviral therapy. **Antiviral Therapy**, v. 10, p. 375–392, 2005.

BOIS, F. Y.; BROCHOT, C. **Modeling Pharmacokinetics**, In Silico Methods for Predicting Drug Toxicity, Methods in Molecular Biology, vol. 1425, New York: Springer Science Business Media, 2016

BORGES, E. M.; GORAIEB, K.; COLLINS, C. H. The challenges of the analysis of basic solutes by reversed phase liquid chromatography: some possible approaches for improved separations. **Quím. Nova**, v. 35, n. 5, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico HIV/AIDS**, número especial, Brasília-DF, dez. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças**, 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos**. 1.ed. Brasília-DF, 2018b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para prevenção da transmissão vertical de HIV, sífilis e hepatites virais**. Brasília-DF, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Tratamento**. 2022. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/hiv/tratamento>. Acesso em: 17 de fevereiro de 2022.

BRASS, A. L. et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. **Science**, v. 319, n. 5865, p. 921–26, jan. 2008.

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

BUCKOREELALL, K.; CRESSEY, T. R.; KING, J. R. Pharmacokinetic Optimization of Antiretroviral Therapy in Pregnancy. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 51, n. 10, p. 639-59, out. 2012.

BUCLIN, T.; NICOD, M.; KELLENBERGER, S. **Population pharmacokinetics**. 2009. Disponível em: <https://sepia.unil.ch/pharmacology/index.php?id=75>. Acesso em: 2 de novembro de 2021.

BUSHMAN, F. D.; CRAIGIE, R. Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein in vitro: specific cleavage and integration of HIV DNA. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, n. 4, p. 1339–43, fev. 1991.

CAPIAU, S., et al. Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot–Based

- Methods for Therapeutic Drug Monitoring. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 41, n. 4, p. 409-430, 2019.
- CASTILLO-MANCILLA, J. R. et al. Tenofovir, Emtricitabine, and Tenofovir Diphosphate in Dried Blood Spots for Determining Recent and Cumulative Drug Exposure. **Aids Research and Human Retroviruses**, v. 29, n. 2, 2013.
- CATTANEO, D. et al. Is it time to revise antiretrovirals dosing? a pharmacokinetic viewpoint. **AIDS**, v. 28, n. 16, p. 2477-80, 2014.
- CATTANEO, D., et al. Inter- and intra-patient variability of raltegravir pharmacokinetics in HIV-1-infected subjects. **Antimicrob Chemother.**, v. 67, p. 460–464, 2012.
- CHARBE, N. B. Bio-analytical Assay Methods used in Therapeutic Drug Monitoring of Antiretroviral Drugs-A Review. **Current Drug Therapy**, v. 14, n. 1, 2019.
- CHARLES, B. Population pharmacokinetics: an overview. **Australian Prescriber**, v. 37, n. 6, p. 210–213, 2014.
- CHEN, P. et al. Virological synapses allow HIV-1 uptake and gene expression in renal tubular epithelial cells. **J Am Soc Nephrol**, v. 22, n. 3, p. 496–507, fev. 2011.
- CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quim. Nova.**, v. 31, n. 3, p. 623-636, fev. 2008.
- CHILAKA, V. N.; KONJE, J. C. HIV in pregnancy – An update. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 256, p. 484–491, 2021.
- COHEN, M. S. et al. Prevention of HIV-1 infection with early antirretroviral therapy. **N Engl J Med**, v. 365, n. 6, p. 493–505, ago. 2011.
- COSTA, C. C. P. et al. The Efavirenz: Structure-Activity Relationship and Synthesis Methods. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p.1347-1370, 2015.
- COSTANTINE, M. M. Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. **Front Pharmacol.**, v. 5, n. 65, p. 1-5, 2014.
- CRESSEY, T. R. Efavirenz pharmacokinetics during the third trimester of pregnancy and postpartum. **J Acquir Immune Defic Syndr.**, v. 59, n. 3, p. 245-52, mar. 2012.
- CSAJKA, C. et al. Population pharmacokinetics and effects of efavirenz in patients with human immunodeficiency virus infection. **Clinical pharmacology & therapeutics**, v. 73, n.1, p.20-30, 2003.
- D'ARIENZO, C. J. et al. DBS sampling can be used to stabilize prodrugs in drug discovery rodent studies without the addition of esterase inhibitors. **Bioanalysis**, v. 2, p. 1415–22, 2010.
- D'AVOLIO, A. et al. Therapeutic drug monitoring of intracellular anti-infective agents. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p.183–193, dez. 2014.
- DAHRI, K.; ENSOM, M. H. Efavirenz and nevirapine in HIV-1 infection: is there a role for clinical pharmacokinetic monitoring? **Clin Pharmacokinet.**, v. 46, n. 2, p. 109-32, 2007.
- DE KESEL, P. M. M. et al. Current strategies for coping with the hematocrit problem in dried blood spot analysis. **Bioanalysis**, v. 6, p. 1871-1874, 2014.

- DE SANTIS, M. et al. Periconceptional exposure to efavirenz and neural tube defects. **Arch Intern Med.**, p. 162-355, 2002.
- DESTA, Z. et al. Impact of CYP2B6 polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro. **Pharmacogenomics**, v. 8, p. 547–558, 2007.
- DONG, B. J. Efavirenz (DuPont Pharmaceuticals Co). **IDrugs**, v.1, n.6, p.700-711, 1998.
- DOOLEY, K. E. et al. Pharmacokinetics of Efavirenz and Treatment of HIV-1 Among Pregnant Women With and Without Tuberculosis Coinfection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 211, p. 197–205, 2015.
- DURANT, J. et al. Importance of protease inhibitor plasma levels in HIV-infected patients treated with genotypic-guided therapy: pharmacological data from the Viradapt Study. **AIDS**, v. 14, n. 10, p. 1333-9, 2000.
- DUTHALER, U. et al. Automated high throughput analysis of antiretroviral drugs in dried blood spots. **J. Mass Spectrom.**, v. 52, p. 534–542, 2017.
- DUTHALER, U. Using dried blood spots to facilitate therapeutic drug monitoring of antiretroviral drugs in resource-poor regions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 10, p. 2729–2737, 2018.
- EDELBROEK, P. M.; VAN DER HEIJDEN, J.; STOLK, L. M. L. Dried Blood Spot Methods in Therapeutic Drug Monitoring: Methods, Assays, and Pitfalls. **Ther Drug Monit.**, v. 31, n. 3, p. 327-36, jun. 2009.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Assessment report: Ritonavir Mylan**. 2017. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/ritonavir-mylan-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/ritonavir-mylan-epar-public-assessment-report_en.pdf). Acesso em 10 de janeiro de 2022.
- FABBIANI, M. et al. Pharmacokinetic variability of antiretroviral drugs and correlation with virological outcome: 2 years of experience in routine clinical practice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.64, p.109–117, 2009.
- FAN, X. et al. Design of HIV-1 integrase inhibitors targeting the catalytic domain as well as its interaction with LEDGF/p75: a scaffold hopping approach using salicylate and catechol groups. **Bioorg Med Chem.**, v. 19, n. 16, p. 4935-4952, ago. 2011.
- FEGHALI, M.; VENKATARAMANAN, R.; CARITIS, S. Pharmacokinetics of drugs in pregnancy. **Seminars in Perinatology**, v. 39, n. 7, p. 512-9, 2015.
- FELDMAN, D. N. et al. CYP1A1 genotype modifies the impact of smoking on effectiveness of HAART among women. **AIDS Educ Prev.**, v. 21, p. 81-93, 2009.
- FILALI-ANSARY, A. et al. Dried Blood Spot Methodology in Combination With Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Facilitates the Monitoring of Teriflunomide. **Ther Drug Monit.**, v. 38, n. 4, p. 471-482, 2016.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry**. 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>. Acesso em: 18 de janeiro de 2022.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Population Pharmacokinetics Guidance for Industry (DRAFT)**. 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/population-pharmacokinetics>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2022.

FORD, N. et al. Safety of efavirenz in the first trimester of pregnancy: an updated systematic review and meta-analysis. **AIDS**, v. 28, n. 2, p. 123-131, 2014.

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

FUNDARO, C. et al. Myelomeningocele in a child with intrauterine exposure to efavirenz. **AIDS**, v. 16, p. 299–300, 2002.

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

GHICULESCU, R. A. Therapeutic drug monitoring: which drugs, why, when and how to do it. **Austr Prescr.**, v. 31, p. 42–44, 2008.

GIACOMELLI, A. et al. Clinical and genetic factors associated with increased risk of severe liver toxicity in a monocentric cohort of HIV positive patients receiving nevirapine-based antiretroviral therapy. **Bmc Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p.1-8, 12 nov. 2018.

GIBB, M. D.; TESS, B. H. Interventions to reduce mother-to-child transmission of HIV infection: new developments and current controversies. **AIDS**, v. 13, suppl A :S93–S102, 1999.

GIBBON, C. **South African Medical Formulary**. 7.ed. Cape Town: Health and Medical Publishing Group, SAMA, 2005.

GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

GOLAN, D. E. et al. **Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2014.

GREENBERG, M. L.; CAMMACK, N. Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. **J Antimicrob Chemother.**, v. 54, n. 2, p. 333–40, ago. 2004.

GUTIERREZ, M. M. Drug safety profile of integrase strand transfer inhibitors. **Expert Opin. Drug Saf.**, v. 13, n. 4, p. 431-45, 2014.

HEINE, R. et al., Quantification of protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in dried blood spots by liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 867, n. 2, p. 205–212, mai. 2008.

HEINE, R., et al. Quantification of protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in dried blood spots by liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 867, n. 2, p. 205–212, 2008.

HOFFMANN, C. J. et al. Hepatotoxicity in an African antiretroviral therapy cohort: the effect of tuberculosis and hepatitis B. **AIDS**, v. 21, n. 10, p. 1301–8, jun. 2007.

HOFFMANN, C.; ROCKSTROH, J. **HIV 2015/16**. 1.ed. Hamburg: Medizin Fokus Verlag, 2015.

HUGHES, P. J. et al. Protease inhibitors for patients with HIV-1 infection: A comparative overview. **P T.**, v. 36, n. 6, p. 332-45, jun. 2011.

HUGO, W. B.; RUSSELL, A. D. **Pharmaceutical Microbiology**. 6.ed. London: Blackwell Science Ltd, 1998.

INTERNATIONAL AIDS VACCINE INITIATIVE (IAVI). **IAVI G002**. 2022. Disponível em: <https://www.avac.org/trial/iavi-g002>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2022.

JAMEI, M. Recent Advances in Development and Application of Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Models: a Transition from Academic Curiosity to Regulatory Acceptance. **Curr Pharmacol Rep.**, v. 2, p. 161–169, 2016.

JOHNSON-DAVIS, K. L.; DOYLE, K. Therapeutic Drug Monitoring in Pregnant Patients. **Ther Drug Monit.**, doi: 10.1097/FTD.0000000000000709, 2019.

JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS). **Overview Data & Trends: Global Statistics**. 2018. Disponível em: <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/data-and-trends/global-statistics>. Acesso em: 4 de março de 2019.

JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS). **UNAIDS data 2021**. 2021. Disponível em: [https://www.unaids.org/en/resources/documents/2021/2021\\_unaids\\_data](https://www.unaids.org/en/resources/documents/2021/2021_unaids_data). Acesso em: 14 de fevereiro de 2022.

JUNG, B. H, et al. Simultaneous determination of 17 antiretroviral drugs in human plasma for quantitative analysis with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Biomed Chromatogr.**, v. 21, n. 10, p. 1095-104, 2007.

KANG, J.; LEE, M. Overview of Therapeutic Drug Monitoring. **The Korean Journal Of Internal Medicine**, v. 24, n. 1, p.1-10, 2009.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

KOAL, T. et al. Quantification of antiretroviral drugs in dried blood spot samples by means of liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 19, p. 2995–3001, 2005.

KOK, M. G. M.; FILLET, M. Volumetric absorptive microsampling: current advances and applications, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.029>, 2017.

KOSTER, R. A. et al. What is the right blood hematocrit preparation procedure for standards and quality control samples for dried blood spot analysis? **Bioanalysis**, n. 7, p. 345–351, 2015.

KREDO, T. et al. Therapeutic drugmonitoring of antiretrovirals for people with HIV (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 3, DOI: 10.1002/14651858.CD007268.pub2. 2009.

- KREITCHMANN, R. et al. Efavirenz pharmacokinetics during pregnancy and infant washout. **Antivir Ther.**, v. 24, n. 2, p. 95-103, 2019.
- KROMDIJK, W. et al. Use of dried blood spots for the determination of plasma concentrations of nevirapine and efavirenz. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1211–1216, 2012.
- KUMAR, H. et al. Effect of Anticoagulants on Plasma Nevirapine and Efavirenz Concentrations. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 29, n. 5, p. 652-654, 2007.
- KWONG, P. D. et al. Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. **J Virol.**, v. 74, n. 4, p. 1961–72, fev. 2000.
- LAKSHMY, R. Analysis of the Use of Dried Blood Spot Measurements in Disease Screening. **J Diabetes Sci Technol.**, v. 2, n. 2, p. 242-243, mar. 2008.
- LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.
- LARTEY, M. et al. Pharmacokinetics of Efavirenz 600 mg Once Daily During Pregnancy and Post Partum in Ghanaian Women Living With HIV. **Clin Ther.**, v.42, n. 9, p. 1818-1825, set. 2020.
- LEPIK, K. J. et al. Adverse drug reactions to integrase strand transfer inhibitors. **AIDS**, n. 1, doi: 10.1097/QAD.0000000000001781, 2018.
- LEVY, J. A. **HIV and the Pathogenesis of AIDS**. 3.ed. Washington: ASM Press, 2007.
- LI, W.; ZHANG, J.; TSE, F. L. Strategies in quantitative LC-MS/MS analysis of unstable small molecules in biological matrices. **Biomed Chromatogr.**, v. 25, p. 258–77, 2011.
- LIU, Y. et al. CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor. **J Virol**, v. 78, n. 8, p. 4120–33, abr. 2004.
- LUCIW, P. A. **Virology**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.
- MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. **Lancet**, v. 384, n. 19, p. 258-271, jul. 2014.
- MAAT, M. M. R. et al. Subtherapeutic antiretroviral plasma concentrations in routine clinical outpatient HIV care. **Ther Drug Monit.**, v. 25, n. 3, p. 367-73, 2003.
- MANGAL, T. D. et al. Estimating HIV incidence from surveillance data indicates a second wave of infections in Brazil. **Epidemics**, <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2019.02.002>. 2019.
- MARZOLINI, C., et al. Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. **AIDS**, v. 15, n. 1, p. 71-5, 2001.
- MATSUI, D. M. Therapeutic Drug Monitoring in Pregnancy. **Ther Drug Monit.**, v. 34, p. 507–511, 2012.
- MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. **Anal Chem.**, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, jun. 2003.

- MCCANCE-KATZ, E. F. et al. Interactions between alcohol and the antiretroviral medications ritonavir or efavirenz. **J Addict Med.**, v. 7, n. 4, p. 264-70, jul-ago. 2013.
- MCDONAGH, E. M. et al. PharmGKB Summary: Efavirenz Pathway, Pharmacokinetics (PK). **Pharmacogenet Genomics**, v. 25, n. 7, p. 363–376, jul. 2015.
- MEESTERS, R. J. W. et al. Incurred sample reanalysis comparison of dried blood spots and plasma samples on the measurement of lopinavir in clinical samples. **Bioanalysis**, v. 4, p. 237–40, 2012.
- MILLER, L. E. Laboratory Diagnosis of HIV Infection. In: STEVENS, C. D. (Ed.). **Clinical immunology and serology: a laboratory perspective**. 3. ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, cap. 23, 2010.
- MIROCHNICK, M.; BEST, B. M.; CLARKE, D. F. Antiretroviral pharmacology: special issues regarding pregnant women and neonates. **Clin Perinatol.**, v. 37, p. 907–927, 2010.
- MIROCHNICK, M.; CAPPARELLI, E. Pharmacokinetics of Antiretrovirals in Pregnant Women. **Clin Pharmacokinet**, v. 43, n. 15, p. 1071-1087, 2004.
- MOLTO, J. et al. Variability in non-nucleoside reverse transcriptase and protease inhibitor concentrations among HIV-infected adults in routine clinical practice. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 62, n. 5, p. 560-6, 2006.
- MOLTO, J.; CLOTET, B. Therapeutic drug monitoring of antiretroviral agents scenario. **Journal of HIV Therapy**, v. 9, n. 4, p. 75–78, 2004.
- MORTON, A. Hematological Normal Ranges in Pregnancy. In: Glob. libr. women's med (Ed.), **Maternal Medical Health And Disorders in Pregnancy (Volume 8)**. Australia. ISSN: 1756-2228; doi: 10.3843/GLOWM.413403, 2021.
- MOULD, D. R.; UPTON, R. N. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development. **CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, v. 1, n. 9, p. e6, 2012.
- NORRIS, P. J. et al. Fine specificity and cross-clade reactivity of HIV type I Gag-specific CD4<sup>+</sup> T cells. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 20, n. 3, p. 315-325. 2004.
- OGBURN, E. T. et al. Efavirenz primary and secondary metabolism in vitro and in vivo: identification of novel metabolic pathways and cytochrome P450 2A6 as the principal catalyst of efavirenz 7-hydroxylation. **Drug Metab Dispos.**, n. 38, p. 1218–1229, 2010.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Estimated percentage of pregnant women living with HIV who received antiretrovirals for preventing mother-to-child transmission**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-percentage-of-pregnant-women-living-with-hiv-who-received-antiretrovirals-for-preventing-mother-to-child-transmission>. Acesso em: 10 de janeiro de 2022.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **HIV / AIDS**. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>. Acesso em: 4 de março de 2019.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **HIV/AIDS**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/hiv aids#:~:text=Global%20situation%20and%20tr>

ends%3A&text=Globally%2C%2037.7%20million%20%5B30.2%E2%80%93,considerably%20between%20countries%20and%20regions. Acesso em: 14 de fevereiro de 2022.

PANDEY, K. K.; GRANDGENETT, D. P. HIV-1 Integrase Strand Transfer Inhibitors: Novel Insights into their Mechanism of Action. **Retrovirology**, v. 5, n. 2, p. 11–16, nov. 2008.

PARIENTE, G., et al. Pregnancy-Associated Changes in Pharmacokinetics: A Systematic Review. **PLoS Med**, v. 13, n. 11, 2016.

PASSING, H.; BABLOK, W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part I. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 21, p. 709-720, 1983.

POLSON, C. et al. Optimization of Protein Precipitation Based on Effectiveness of Protein Removal and Ionization Effect in Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 785, n. 2, p. 263–275, 2003.

POPOVIC, M. et al. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 497–500, mai. 1984.

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

PRATHIPATI, P. K.; MANDAL, S.; DESTACHE, C. J. LC-MS/MS method for the simultaneous determination of tenofovir, emtricitabine, elvitegravir, and rilpivirine in dried blood spots. **Biomed Chromatogr.**, doi: 10.1002/bmc.4270, 2019.

PUNYAWUDHO, B. et al. Therapeutic drug monitoring of antiretroviral drugs in HIV-infected patients. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, doi: 10.1080/17512433.2016.1235972, set. 2016.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAO, P. K. S. CCR5 inhibitors: Emerging promising HIV therapeutic strategy. **Indian J Sex Transm Dis AIDS**, v. 30, n. 1, p. 1–9, jan. 2009.

RAO, R. N. et al. Development of a validated high-throughput LC-ESI-MS method for determination of sirolimus on dried blood spots. **Biomed Chromatogr.**, v. 24, p. 1356–64, 2010.

RAYNER, C.; DOOLEY, M.; NATION, R. Antivirals for HIV. In: Burton M, Schentag J, Shaw L, Evans W editor(s). **Applied pharmacokinetics & pharmacodynamics, Principles of therapeutic drug monitoring**. 4.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

REEVES, J. D.; DOMS, R. W. Human immunodeficiency virus type 2. **Journal Of General Virology**, v. 83, n. 6, p.1253-1265, jun. 2002.

REUST, C. E. Common Adverse Effects of Antiretroviral Therapy for HIV Disease. **American Family Physician, Kansas City**, p. 1443-1451. jun. 2011.

RODRIGUES, W. C. V.; SOLER, O. Compulsory licensing of efavirenz in Brazil in 2007: contextualization. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health**, v. 26, n. 6, p. 553-559, 2009.

- ROUSTIT, M. et al. Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of antiretrovirals in pregnant women. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 66, n. 2, p. 179–195, 2008.
- SAINT-MARCOUX, F.; SAUVAGE, F.; MARQUET, P. Current role of LC-MS in therapeutic drug monitoring. **Anal Bioanal Chem.**, v. 388, p. 1327–1349, mai. 2007.
- SAUTER, D. et al. Human tetherin exerts strong selection pressure on the HIV-1 group N Vpu protein. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 12, p. 1-17, dez. 2012.
- SHARMA, B. Advances in Development of Integrase inhibitors as anti HIV1 Regimen. **Journal of HIV & Retro Virus**, v. 1, n. 1, p. 1-3, 2015.
- SILVA, E.; STUMPF, M. P. HIV and the CCR5-Delta32 resistance allele. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 241, n. 1, p. 1–12, dez. 2004.
- SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V. Drogas anti-VIH: passado, presente e perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p.366-372, mai. 2003.
- SPENCE, R. A. et al. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. **Science**, v. 267, n. 5200, p. 988-993, 1995.
- STEMPEL, J. M. et al. False positive fourth generation HIV test in a patient with severe malaria. **International Journal Of Infectious Diseases**, v. 83, p.86-87, jun. 2019.
- TEIXEIRA, L. S. L. et al. Prevalence of smoking and associated factors in people living with HIV undergoing treatment. **Rev. Saúde Pública**, v. 54, n. 108, 2020.
- TER HEINE, R. et al. Clinical evaluation of the determination of plasma concentrations of darunavir, etravirine, raltegravir and ritonavir in dried blood spot samples. **Bioanalysis**, v. 3, n. 10, p. 1093–1097, 2011.
- TER HEINE, R. et al. Quantification of protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in dried blood spots by liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 867, n. 2, p. 205–212, 2008.
- TIEC, C. L. et al. Clinical Pharmacokinetics and Summary of Efficacy and Tolerability of Atazanavir. **Clin Pharmacokinet.**, v. 44, p. 1035–1050, 2005.
- TIMMERMAN, P. et al. EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots. **Bioanalysis.**, v. 3, p. 1567–75, 2011.
- TITONELI, C. et al. The relevance of using ART to prevent vertical HIV transmission. **Revista Caderno de Medicina**, v. 2, n. 2, p.71-78, 2019.
- TOWNSEND, C. L. et al. Low rates of mother-to-child transmission of HIV following effective pregnancy interventions in the United Kingdom and Ireland, 2000-2006. **AIDS**, v. 22, n. 8, p. 973–981, mai. 2008.
- TSUCHIYA, K. et al. Homozygous CYP2B6 \*6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 319, n. 4, p. 1322-6, jul. 2004.
- TUBIANA, R. et al. Factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 despite a maternal viral load <500 copies/ml at delivery: a casecontrol study nested in the french perinatal cohort (EPF-ANRS CO1). **Clin Infect Dis.**, v. 50, n. 4, p. 585–596, fev. 2010.

UNITED NATIONS INTERNATIONAL CHILDREN'S EMERGENCY FUND (UNICEF).

**Elimination of mother-to-child transmission.** 2021. Disponível em: <https://data.unicef.org/topic/hivaids/emtct/>. Acesso em: 10 de janeiro de 2022.

VAN LUIN, M.; KUKS, P. F.; BURGER, D. M. Use of therapeutic drug monitoring in HIV disease. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 3, n. 3, p. 266-71, 2008.

VRIES-SLUIJS, T. E. et al. Low nevirapine plasma concentrations predict virological failure in an unselected HIV-1-infected population. **Clin Pharmacokinet.**, v. 42, n. 6, p. 599-605, 2003.

VROUENRAETS, S. M. E. *et al.* Efavirenz: a review. **Informa UK Ltd.** 2007. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/loi/ieop20>. Acesso em: 20 maio 2021.

WAITT, C. et al. Development, validation and clinical application of a method for the simultaneous quantification of lamivudine, emtricitabine and tenofovir in dried blood and dried breast milk spots using LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1060, p. 300–307, 2017.

WARD, B. A. et al. The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 306, p. 287-300, 2003.

WEINBERG, A. et al. Kinetics and Determining Factors of the Virologic Response to Antiretrovirals during Pregnancy. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, doi: <https://doi.org/10.1155/2009/621780>, 2009.

WILHELM, A. J. et al. Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions. **Clin Pharmacokinet.**, v. 53, p. 961–973, 2014.

YENI, P. G. *et al.* Treatment for adult HIV infection: 2004 recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. **JAMA**, v. 292, n. 2, p. 251-265, 2004.

ZAKARIA, R. et al. Advantages and Challenges of Dried Blood Spot Analysis by Mass Spectrometry Across the Total Testing Process. **EJIFCC**, v. 27, n. 4, p. 288–317, 2016.

ZHENG, J. et al. Quantitation of Tenofovir and Emtricitabine in Dried Blood Spots (DBS) with LC-MS/MS. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 88, doi:10.1016/j.jpba.2013.08.033, 2014.

## APÊNDICE A - FORMULÁRIO DE RECRUTAMENTO

Esquema: RAL ( ) EFZ ( ) ATZ/RTV ( )

Data do recrutamento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### IDENTIFICAÇÃO

1. Número de identificação: \_\_\_\_\_
2. Número do prontuário: \_\_\_\_\_

### PERFIL SOCIO-DEMOGRÁFICO

3. Quantidade de semanas de gestação? \_\_\_\_\_
4. O diagnóstico veio por ocasião da realização do pré-natal? \_\_\_\_\_
5. Idade: \_\_\_\_\_
6. Raça? ( ) Branca ( ) Preta ( ) Amarela ( ) Parda ( ) Indígena

### ÁLCOOL E OUTRAS DROGAS

7. No último mês, fez uso de:
- (A) Bebida alcoólica: ( ) Não ( ) Sim
- (B) Cigarro: ( ) Não ( ) Sim

### MEDICAMENTOS

8. Início do tratamento antirretroviral atual: \_\_\_\_\_
9. ARV(s) em uso atualmente (Receita / Prontuário) e horário da tomada da última dose do(s)  
ARV(s):
  - ARV 1: \_\_\_\_\_ Horário ARV 1: \_\_\_\_\_: \_\_\_\_\_ ( )  
Alimento
  - ARV 2: \_\_\_\_\_ Horário ARV 2: \_\_\_\_\_: \_\_\_\_\_ ( )  
Alimento
  - ARV 3: \_\_\_\_\_ Horário ARV 3: \_\_\_\_\_: \_\_\_\_\_ ( )  
Alimento
  - ARV 4: \_\_\_\_\_ Horário ARV 4: \_\_\_\_\_: \_\_\_\_\_ ( )  
Alimento
10. Outros medicamentos em uso: \_\_\_\_\_

## PRONTUÁRIO

### DADOS ANTROPOMÉTRICOS

1. Peso (Kg): \_\_\_\_\_
2. Altura (cm): \_\_\_\_\_
3. IMC (Kg/m<sup>2</sup>): \_\_\_\_\_
4. Circunferência abdominal (cm): \_\_\_\_\_
5. Pressão arterial sistêmica (mmHg): \_\_\_\_\_

### MEDICAMENTOS

6. ARV(s) prescrito(s):
  - ARV 1: \_\_\_\_\_
  - ARV 2: \_\_\_\_\_
  - ARV 3: \_\_\_\_\_
  - ARV 4: \_\_\_\_\_
7. Há registro de troca de algum ARV entre a primeira prescrição de ARV e a última consulta:  
 Não       Sim
8. Há registro de outra medicação, de uso contínuo ou regular, diferente dos antirretrovirais:  
 Não       Sim
  - Se não, passar para a próxima questão. Se sim, especificar:  
 Medicamento / Dose / Horário: \_\_\_\_\_

### EXAMES LABORATORIAIS

9. Linfócito T:

Data	CD4 absoluto	CD4 relativo

10. Carga viral:

Data	Valor absoluto	Log

## 11. Função hepática:

Data	AST	ALT	FA

## 12. Função renal:

Data	Ureia	Creatinina

## APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
NÚCLEO DE DESENVOLVIMENTO FARMACÊUTICO E  
COSMÉTICO



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “**Monitorização terapêutica de antirretrovirais através da técnica de *Dried Blood Spot* e quantificação por LC-MS/MS**”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora MSc. Maira Ludna Duarte, Rua Arthur de Sá, S/N, Recife – PE, CEP: 50740-520, telefone: (81) 9 9697-2189, e-mail: mairaludna@gmail.com.

Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor, telefone: (81) 9782-4140 e está sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Leila Bastos Leal, telefone: (81) 9 9451-6044, e-mail leila.leal@nudfac.com.br.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

O objetivo desta pesquisa é realizar monitorização terapêutica de antirretrovirais em pacientes pediátricos, adultos e gestantes atendidos por instituições referência no tratamento de HIV/AIDS na cidade do Recife-PE, utilizando a técnica de *Dried Blood Spot* para coleta de amostras e quantificação por LC-MS/MS. A aplicação clínica da monitorização terapêutica em pacientes com HIV/AIDS é considerada útil em diversas circunstâncias e traz numerosas vantagens para o tratamento do paciente - permitindo a otimização de resultados clínicos, a investigação da não adesão e a redução da resistência viral à terapia – além de racionalizar os custos e protocolos clínicos nos serviços de saúde.

Durante o presente estudo serão realizadas entrevistas, por profissional treinado em ambiente reservado, com todos os participantes utilizando um questionário padronizado. Os participantes incluídos no estudo piloto para estabelecimento da correlação entre as concentrações plasmática e sanguínea dos antirretrovirais cederão amostras de sangue, coletada por punção venosa, um tubo de aproximadamente 5mL, e por punção capilar, 3-5 gotas. A coleta por punção venosa será incluída na rotina do acompanhamento clínico-ambulatorial do paciente, já a coleta por punção capilar será realizada através de uma injúria no dedo do participante utilizando uma lanceta, as gotas obtidas serão coletadas no cartão de coleta (DBS).

O estudo prevê ainda o acompanhamento de indivíduos vivendo com HIV/AIDS por até dois anos, compreendendo nesse período um total de quatro visitas com um intervalo máximo de 6 meses entre elas. Os participantes desta etapa deverão comparecer ao serviço de saúde ao qual estão vinculados nas datas agendadas previamente com a equipe de pesquisadores, respeitando os prazos de tolerância estabelecidos. Em cada encontro serão realizados: uma coleta de sangue por punção capilar, 3-5 gotas coletadas em DBS; uma entrevista utilizando um formulário de acompanhamento padronizado; e anotação de dados clínicos presentes no prontuário do participante.

Os riscos diretos ao voluntário consistem em potencial constrangimento ao responder às perguntas realizadas na entrevista e desconforto ou leve dor durante as coletas de amostra. Você terá assegurada a sua liberdade de negar-se a responder qualquer questionamento que o deixe em situação desconfortável ou de constrangimento. Em caso de ocorrência de qualquer dano ou prejuízo decorrentes dos procedimentos de coleta de sangue, seja por punção venosa ou capilar, serão tomadas as providências necessárias para a sua recuperação sem consequências negativas, sendo a equipe de pesquisadores responsável pela tomada das ações preventivas, corretivas e de custeio.

O presente estudo traz benefícios diretos aos participantes acompanhados durante a monitorização terapêutica dos antirretrovirais, uma vez que objetiva a otimização da farmacoterapia antirretroviral de cada indivíduo, resultando em sua maior eficácia e menor toxicidade. Além disso, o estudo contribuirá para o conhecimento atual sobre a monitorização terapêutica de antirretrovirais nos grupos-alvo e a aplicabilidade dos cartões de DBS na coleta de sangue em estudos farmacocinéticos.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo,

sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa, ficarão armazenados em pastas de arquivo, sob a responsabilidade da pesquisadora principal, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (**Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: [cepccs@ufpe.br](mailto:cepccs@ufpe.br)**).

---

(assinatura do pesquisador)

#### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com a pesquisadora responsável, concordo em participar do estudo “**Monitorização terapêutica de antirretrovirais através da técnica de Dried Blood Spot e quantificação por LC-MS/MS**”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data: \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.** (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

## ANEXO A – CARTA DE ANUÊNCIA

Instituto de Medicina Integral  
 Prof. Fernando Figueira  
 Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil  
 Instituição Civil Filantrópica



## CARTA DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins, que aceitaremos a pesquisadora **Maira Ludna Duarte** a desenvolver o seu projeto de pesquisa **Monitorização Terapêutica de antirretrovirais através da técnica de *Dried Blood Spot* e quantificação por LC-MS/MS** nesta instituição, cujo objetivo é realizar monitorização terapêutica de antirretrovirais em pacientes pediátricos, adultos e gestantes atendidos por instituições referência no tratamento de HIV/AIDS na cidade do Recife-PE, utilizando a técnica de *Dried Blood Spot* para coleta de amostras e quantificação por LC-MS/MS. O projeto terá **Dr. Luiz Cláudio Arraes de Alencar** como responsável no IMIP.

Esta autorização está condicionada ao cumprimento do (a) pesquisador (a) aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se a utilizar os dados pessoais dos participantes da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Antes de iniciar a coleta de dados o protocolo deve ser aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humano do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira CEP-IMIP Credenciado ao sistema CEP/CONEP

Recife, 18 de Setembro de 2018.

Carimbo e Assinatura da Chefe do Setor

ESTADO DA PERNAMBUCO - Recife  
 PREFEITURA MUNICIPAL DE RECIFE - PE  
 SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE  
 INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA  
 Rua dos Caribos, 300 - Boa Vista  
 Recife - PE - Brasil CEP 50070-550  
 Fone: (51) 3477-1100  
 Fax: (51) 3477-4174 - Postal 1493  
 E-mail: imip@imip.org.br  
 Home Page: http://www.imip.org.br

ESTADO DA PERNAMBUCO - Recife  
 PREFEITURA MUNICIPAL DE RECIFE - PE  
 SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE  
 INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA  
 Rua dos Caribos, 300 - Boa Vista  
 Recife - PE - Brasil CEP 50070-550  
 Fone: (51) 3477-1100  
 Fax: (51) 3477-4174 - Postal 1493  
 E-mail: imip@imip.org.br  
 Home Page: http://www.imip.org.br

## ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DE USO DE DADOS

Instituto de Medicina Integral  
 Prof. Fernando Figueira  
 Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil  
 Instituição Civil Filantrópica



### AUTORIZAÇÃO DE USO DE DADOS

Declaramos para os devidos fins, que cederemos ao/à pesquisadora MAIRA LUDNA DUARTE, o acesso aos dados de prontuários para serem utilizados na pesquisa: "MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE ANTIRRETROVIRAIS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DRIED BLOOD SPOT E QUANTIFICAÇÃO POR LC-MS/MS", que está sob a orientação da Profa. Dra. Leila Bastos Leal.

Esta autorização está condicionada ao cumprimento da pesquisadora aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se a mesma a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Antes de iniciar a coleta de dados o/a pesquisador/a deverá apresentar o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido por Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado ao Sistema CEP/CONEP.

Recife, 20 de julho de 2018.

Carimbo e Assinatura da Chefia do Setor.

## ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE ANTIRRETROVIRAIS UTILIZANDO LC-MS/MS

**Pesquisador:** Maira Ludna

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 85694318.9.0000.5208

**Instituição Proponente:** CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.410.426

#### Apresentação do Projeto:

O projeto “Monitorização terapêutica de antirretrovirais através da técnica de Dried Blood Spot e quantificação por LC-MS/MS” tem como responsável Maira Ludna Duarte, doutoranda do Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE, tendo como orientadora a Profa. Dra. Leila Bastos Leal e como co-orientador o Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor, ambos professores do Depto. de Ciências Farmacêuticas da UFPE. A equipe de pesquisa tem mais sete pesquisadores, sendo da UFPE, do HC/UFPE, do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e da Universidade Federal de São João del-Rei. O projeto propõe a realização de um estudo transversal objetivando a monitorização terapêutica de antirretrovirais de três classes farmacológicas (inibidores da transcriptase reversa não- análogos de nucleosídeo - ITRNNs, inibidores da protease – IPs e inibidor da integrase - INIs) em pessoas vivendo com HIV. Os pacientes selecionados para a realização deste projeto serão recrutados em cinco serviços de referência no atendimento de indivíduos infectados com HIV no estado de Pernambuco.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Geral:**

Realizar monitorização terapêutica de antirretrovirais em pacientes pediátricos, adultos e gestantes atendidos por instituições referência no tratamento de HIV/AIDS na cidade do Recife-PE, utilizando a técnica de Dried Blood Spot para coleta de amostras e quantificação por LC-MS/MS.

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.740-600

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-8588

**E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.410.426

Orçamento	Orcamento.pdf	15:46:33	Maira Ludna	Aceito
-----------	---------------	----------	-------------	--------

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 25 de Junho de 2019

---

**Assinado por:**  
**LUCIANO TAVARES MONTENEGRO**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br