

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**MODELAGEM FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÂMICA DO ANTIFÚNGICO
FLUCONAZOL**

**Doutorando: Francine Johansson Azeredo
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Teresa Dalla Costa**

Porto Alegre, Março de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MODELAGEM FARMACOCINÉTICA/FARMACODINÂMICA DO ANTIFÚNGICO
FLUCONAZOL

Tese apresentada por Francine Johansson Azeredo
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR
em Ciências Farmacêuticas

Orientador(a): Profa. Dra. Teresa Dalla Costa

Porto Alegre, 2013

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27.03.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Leandro Tasso

Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Sydey Hartz Alves

Universidade Federal de Santa Maria

Azeredo, Francine Johansson
Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica do
Antifúngico Fluconazol / Francine Johansson Azeredo.
-- 2013.
121 f.

Orientadora: Teresa Dalla Costa.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Fluconazol. 2. Microdiálise Renal. 3. Candida spp.. 4. Modelo de Infecção in vitro. 5. Modelagem PK/PD. I. Dalla Costa, Teresa, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 e Centro Bioanalítico de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre – RS, com financiamento CNPq. A autora recebeu bolsa de doutorado do CNPq.

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”

Eduardo Galeano

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Teresa Dalla Costa não somente pela orientação deste trabalho, mas por toda a contribuição dada na minha formação científica e acadêmica nestes anos de convívio e, principalmente, por ser um grande exemplo de profissionalismo e competência.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela oportunidade em desenvolver este trabalho de Tese.

Ao Prof. Dr. Hartmut Derendorf por todo o aprendizado e hospitalidade durante o meu Doutorado Sanduíche na Universidade de Flórida.

A Profa Dra Bibiana Verlindo de Araújo pelas ótimas conversas e discussões, auxiliando o o meu crescimento profissional e pessoal.

A todos os professores que avaliaram este trabalho nas diferentes etapas deste.

Ao pessoal do laboratório 405 e do CBIM da Faculdade de Farmácia, amigos e colegas com quem convivi durante o tempo de iniciação científica e doutorado, especialmente a Flávia, Clarissa, Moacir, Sandra, Bruna, Maiara, Cristiane e Karina, pelo auxílio em todas as etapas do presente trabalho, pelas discussões nos seminários e pelos momentos de lazer.

A Profa. Dra. Fabiana Horn, por ter me mostrado o significado de ciência e instigado em mim uma curiosidade pelo aprendizado no início de minha formação.

A minha mãe Rejane e meu pai Ariosto, pelo amor, carinho, cuidado e apoio incondicional durante todas as etapas da minha vida e pelo forte exemplo de cidadania e caráter.

Ao meu irmão Gabriel, pelo companheirismo no dia-a-dia de nossas vidas.

As minhas amigas-irmãs Andréa, Aline, Juliana, Marina, Clarisse, Isabel, Marília, Elise, Fabiana, Monique e Tatiane, por estarem sempre presentes nos momentos que mais preciso, tornando a minha vida muito mais leve e divertida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura química do fluconazol, antifúngico azólico.....	29
Figura 1.2. Índices farmacocinéticos/farmacodinâmicos (PK/PD) empregados na avaliação de eficácia de antimicrobianos.....	32
Figura 2.1. Chemical structure of fluconazole.....	58
Figura 2.2. Representative LC–MS/MS chromatogram obtained from the low QC plasma sample containing Fluconazole.....	58
Figura 2.3. Mean plasma concentration-time profile of FCZ after single i.v. dosing of 1 mg/kg to male Wistar rats	58
Figura 3.1. Mean FCZ total plasma and free kidney concentration–time profiles in healthy and <i>C. albicans</i> infected Wistar rats after 50 mg/kg oral or 10 mg/kg i.v <i>bolus</i> dosing....	78
Figura 4.1. Fluconazole fitted time–kill curves against <i>Candida albicans</i> following 200 mg every 24 h (q24h), 200 mg every 12 h (q12h), 200 mg every 8 h (q8h), 400 mg q24h, 400 mg q12h, 400 mg q8h, 800 mg q24h, 800 mg q12h, and 800 mg q8h.....	95
Figura 4.2. Fluconazole fitted time–kill curves against <i>Candida parapsilosis</i> following 200 mg every 24 h (q24h), 200 mg every 12 h (q12h), 200 mg every 8h (q8h), 400 mg q24h, 400 mg q12h, 400 mg q8h, 800 mg q24h, 800 mg q12h, and 800 mg q8h.....	96
Figura 4.3. Fluconazole fitted time–kill curves against <i>Candida tropicalis</i> following 200 mg every 24 h (q24h), 200 mg every 12 h (12h), 200 mg every 8h (q8h), 400 mg q24h, 400 mg q12h, 400 mg q8h, 800 mg q24h, 800 mg q12h, and 800 mg q8h.....	97
Figura 4.4. Fluconazole fitted time–kill curves against <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> and <i>C. tropicalis</i> following different MIC multiples constant concentrations	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Percentual de espécies de <i>Candida</i> associadas à candidíases no Brasil.....	27
Tabela 1.2. Parâmetros farmacocinéticos do fluconazol em diversas espécies animais.	30
Tabela 1.3. Atividade <i>in vitro</i> do fluconazol contra diferentes espécies de <i>Candida</i>	31
Tabela 2.1. Calibration curve parameters and statistics for FCZ in rat plasma 55
Tabela 2.2. Intra and inter-day variation of FCZ quantification in rat plasma.....	56
Tabela 2.3. Accuracy of FCZ quantification in rat plasma.....	56
Tabela 2.4. Results of stability study with FCZ in rat plasma samples.....	57
Tabela 3.1. Pharmacokinetic parameters estimated after a single i.v. <i>bolus</i> 10 mg/kg dose of FCZ to healthy and <i>C. albicans</i> infected rats 76
Tabela 3.2. Pharmacokinetic parameters estimated after a 50 mg/kg oral dose of FCZ to healthy and <i>C. albicans</i> infected rats.....	77
Tabela 4.1. PK/PD parameters determined by modeling the effect of FCZ against <i>Candida albicans</i> using a sigmoidal Emax model.....	99
Tabela 4.2 PK/PD parameters determined by modeling the effect of FCZ against <i>Candida parapsilosis</i> using a sigmoidal Emax model.....	100
Tabela 4.3 PK/PD parameters determined by modeling the effect of FCZ against <i>Candida tropicalis</i> using a sigmoidal Emax model.....	101

RESUMO

Objetivos: O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de um modelo PK/PD capaz de descrever o efeito fungistático de fluconazol (FCZ) contra diferentes espécies de *Candida*. **Método:** a fim de atingir esse objetivo, as seguintes etapas foram realizadas: i) métodos bioanalíticos foram desenvolvidos e validados em CL-EM/EM e CLAE/UV para a determinação do FCZ em plasma e microdialisado renal de rato, respectivamente; ii) a verificação das condições da microdiálise do FCZ e sua recuperação *in vitro* pelos métodos da diálise (RRD) e retrodiálise (RRE) e *in vivo* por RRE; iii) avaliação das concentrações livres de FCZ no rim de ratos Wistar saudáveis e infectados por *Candida albicans* através do uso da microdiálise após a administração de 10 mg/kg de FCZ pela via intravenosa e de 50 mg/kg de FCZ pela via oral, a fim de estabelecer a relação entre os níveis livres renais e plasmáticos totais do FCZ em ambas as condições, iv) a modelagem PK/PD do efeito fungistático do FCZ contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* empregando o modelo de E_{max} -modificado e a determinação de seus parâmetros PK/PD utilizando um modelo de infecção *in vitro*, em que as concentrações renais livres de FCZ esperadas em seres humanos após diferentes posologias foram simuladas: a) concentrações flutuantes do fármaco - 200, 400 e 800 mg q8h, q12h e q24h - e concentrações constantes, múltiplas da concentração inibitória mínima (CIM) – 0,5, 1, 2, 4 e 8 vezes a CIM. Os dados de farmacocinética e farmacodinâmica foram modelados com o auxílio do software Scientist®. **Resultados e Conclusões:** i) os métodos analíticos para quantificação do FCZ foram desenvolvidos e validados, sendo específicos, exatos e precisos, com limites de quantificação de 100 ng/mL e 10 ng/mL para detecção em plasma e microdialisado, respectivamente, ii) as recuperações determinadas *in vitro* por RRD e RRE foram independentes do fluxo e da concentração. Os valores de recuperação das sondas de microdiálise determinada *in vitro* por RRD ($53,4 \pm 2,3\%$) e RRE ($54,2 \pm 1,8\%$) e *in vivo* por RRE ($49,7 \pm 2,2\%$) foram estatisticamente semelhantes nas condições experimentais investigadas ($\alpha = 0,05$), indicando que o FCZ é um fármaco adequado para ser avaliado por esta abordagem; iii) não houve diferença estatística na área sob a curva de concentração *versus* tempo ($AUC_{0-\infty}$) renal livre e plasmática total em ratos Wistar, saudáveis ou infectados por *Candida albicans*, pela mesma via de administração investigada. A penetração renal do FCZ foi semelhante para ambas as doses nas condições investigadas (variando entre 0,77 e 0,84)

e a sua fração plasmática livre, determinada por microdiálise, foi independente da concentração ($86,0 \pm 2,0\%$). Utilizando as equações farmacocinéticas apropriadas, os parâmetros plasmáticos farmacocinéticos determinados foram capazes de prever os valores de concentrações livres renais em ratos saudáveis e infectados, assumindo que a ligação a proteínas plasmáticas é conhecida. Além disso, a candidíase sistêmica não interfere na penetração renal do FCZ, indicando que as suas concentrações plasmáticas livres são boas preditoras do valor de concentração tecidual livre (farmacologicamente ativa) em animais saudáveis e infectados, podendo ser utilizada para estabelecer e otimizar os regimes posológicos do FCZ para o tratamento de candidíase disseminada; iv) a concentração que causa 50% do efeito fungistático máximo (CE_{50}) do FCZ foi estatisticamente menor para *C. albicans* ($4.4 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$) do que para *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, $8.1 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$ e $8.3 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, ao simular-se diferentes regimes de dose, bem como concentrações constantes do fármaco (CE_{50} , *C. albicans* = $3.5 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$; CE_{50} , *C. parapsilosis* = $6.1 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$; CE_{50} , *C. tropicalis* = $6.5 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$) ($\alpha = 0.05$). A taxa de morte fúngica (k_{max}) foi estatisticamente semelhante para todas as espécies de *Candida* estudadas. (aproximadamente $0,4 \text{ h}^{-1}$) e sempre estatisticamente menor do que a taxa de crescimento fúngico, k_0 (aproximadamente de 2 h^{-1}) ($\alpha = 0,05$). O modelo PK/PD foi capaz de descrever o efeito fungistático do FCZ contra as três espécies de *Candida* investigadas *in vitro*. O FCZ se mostrou igualmente eficaz contra essas leveduras, porém sua potência foi maior frente a *C.albicans* do que frente a *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. O modelo PK/PD utilizado pode ser empregado para simular esquemas posológicos alternativos, para comparar o efeito farmacológico do FCZ com o efeito de outros antifúngicos e, finalmente, para otimizar a terapia deste fármaco para o tratamento de candidíase sistêmica.

Palavras-chave: Fluconazol, Microdiálise Renal, *Candida spp*, Modelo de Infecção *in vitro*, Modelagem PK/PD.

ABSTRACT

Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of the Antifungal Fluconazole

Objective: The aim of this work was the development of a pharmacodynamic/pharmacokinetic (PK/PD) model able to describe the fungistatic effect of fluconazole (FCZ) against *Candida spp.* **Method:** in order to reach this objective, the following steps were realized: i) bioanalytical methods were developed and validated in LC-MS/MS and HPLC/UV for determination FCZ in rat plasma and kidney microdialysate, respectively; ii) analysis of microdialysis of FCZ conditions and its recovery *in vitro* by dialysis (RRD) and retrodialysis (RRE) methods and *in vivo* by RRE; iii) evaluation of free levels of FCZ in the kidney of healthy and *Candida albicans* infected Wistar rats using microdialysis, after a 10 mg/kg i.v. dosing and 50 mg/kg oral dosing in order to establish the relationship between free renal and total plasma levels in both conditions; iv) the fungistatic pharmacological effect of FCZ against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* ATCC strains by pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modeling of the time–kill curves employing an E_{max} model was determined using an *in vitro* infection model, where the free kidney concentrations of FCZ in humans after different posologies were simulated: a) fluctuating drug concentrations - 200, 400 and 800 mg q8h, q12h e q24h – and constant concentrations, multiples of the minimum inhibitory concentrations (MIC) – 0,5, 1, 2, 4 and 8 times the MIC. The pharmacokinetic and pharmacodynamic data were modeled with the software Sientist®. **Results and Conclusions:** i) the analytical methods developed were specific, precise, and accurate with limits of quantification of 100 ng/mL and 10 ng/mL for microdialysate and plasma, respectively; ii) the recoveries determined by RRD and RRE *in vitro* were concentration independent and flow rate dependent on the ranges investigated. The recoveries determined *in vitro* by RRD ($53.4 \pm 2.3\%$) and RRE ($54.2 \pm 1.8\%$) and *in vivo* by RRE ($52.3 \pm 2.3\%$) were statistically similar under the experimental conditions investigated ($\alpha = 0.05$), indicating that FCZ is a suitable drug to be evaluated by microdialysis; iii) There were no statistical differences between the area under the free concentration-time curve ($AUC_{0-\infty}$) in plasma and in tissue for either healthy or infected groups for the same dose regimen investigated. The antifungal tissue penetration was similar for both doses and all conditions investigated (ranging from 0.77 to 0.84). Unbound FCZ plasma fraction, determined by microdialysis, was concentration-independent ($86.0 \pm 2.0\%$). Using appropriate equations, pharmacokinetic (PK) parameters determined by fitting plasma

concentration-time profiles were able to predict free renal levels. The results showed FCZ easily penetrates the kidney and PK parameters determined in plasma can be used to predict free tissue levels of the drug assuming the drug protein binding is known. Furthermore, systemic candidiasis does not interfere with the drug kidney penetration, indicating that free plasma concentrations are a good surrogate for active levels in both healthy and infected kidney and can be used to establish and optimize FCZ dosing regimens to treat disseminated candidiasis; iv) FCZ concentration necessary to produce 50% of the maximal fungistatic effect (EC_{50}) was statistically smaller against *C. albicans* ($4.4 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$) than against *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, $8.1 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$ and $8.3 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$ respectively, when simulating multiple dosing regimens as well as constant concentrations (EC_{50} , *C. albicans* = $3.5 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$; EC_{50} , *C. parapsilosis* = $6.1 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$; EC_{50} , *C. tropicalis* = $6.5 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$) ($\alpha = 0.05$). The maximum killing rate constant (k_{max}) was statistically similar for the *Candida spp.* (approximately 0.4 h^{-1}) and always statistically smaller than the natural growth rate k_0 (approximately 2 h^{-1}) ($\alpha = 0.05$). The PK/PD model was able to describe the fungistatic effect of fluconazole *in vitro* against the three *Candida spp.* investigated. Fluconazole showed equivalent efficacy against these yeasts and higher potency against *C. albicans* than against *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*. The model can be used to simulate alternative regimens, to compare its pharmacological effect with other antifungals and to optimize FCZ therapy to treat systemic candidiasis.

Keywords: Fluconazole, Renal Microdialysis, *Candida spp.*, *In vitro* Model Infection, PK/PD Modeling

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	19
CAPÍTULO 1. ESTADO-DA-ARTE	25
1 Candidemia.....	27
2 Fluconazol	28
3 Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica	34
4 Microdiálise.....	37
CAPÍTULO 2 - LC/MS-MS Method for Pharmacokinetic Investigation of the Antifungal Fluconazole	41
CAPÍTULO 3 - Comparison of renal penetration of fluconazole in healthy and <i>Candida albicans</i> infected Wistar rats	59
CAPÍTULO 4 - Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model of Fungistatic Effect of Free Renal Levels of Fluconazole against <i>Candida albicans</i>, <i>Candida tropicalis</i> and <i>Candida parapsilosis</i>	79
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS	109
ANEXO – Parecer do Comitê de Ética	123

As infecções fúngicas sistêmicas são um sério problema de saúde pública, pois ocorrem mais freqüentemente na população imunocomprometida, a qual aumentou consideravelmente nas duas últimas décadas. Vários fatores podem ser associados a esse aumento, entre eles pode-se apontar: o prolongamento de tratamentos mais agressivos com quimioterápicos, o aumento do número de transplantes de órgãos sólidos e de medula, o uso de medicamentos imunossupressores para o tratamento de doenças auto-imunes, a expansão do uso de cateteres intravasculares e o surgimento do Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida (HIV) (Sheenan et al., 1999).

Diferentes espécies de *Candida*, dentre as quais as de maior incidência são *albicans*, *tropicalis*, *parapsilosis* e *glabrata*, têm sido apontadas como a quarta principal causa de infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos, com taxa de letalidade em torno de 40%. Entre os pacientes submetidos a transplantes de medula óssea e em tratamento quimioterápico intensivo a mortalidade é superior a 80% (Bustamante, 2005).

O antifúngico azólico fluconazol é o fármaco de escolha para o tratamento de candidemia em pacientes infectados com espécies de *Cryptococcus* e *Candida*, exceto *Candida krusei* (Pappas et al., 2004). Seu efeito global consiste na inibição da replicação do fungo, primariamente através da inibição da enzima 14- α -esterol desmetilase (P-450DM), enzima dependente do citocromo P-450, responsável pela conversão do lanosterol em 14- α -desmetil-lanosterol em uma das etapas de biossíntese do ergosterol, que é componente essencial da membrana do fungo, regulando sua fluidez, permeabilidade e a atividade das enzimas associadas à membrana (Sanati et al., 1997).

Um dos mais surpreendentes aspectos relacionados à terapia com antifúngicos, entretanto, é a falta de consenso quanto ao estabelecimento dos parâmetros norteadores das posologias utilizadas. Embora os índices PK/PD tenham sido recentemente estabelecidos para os antifúngicos, tais como as relações entre pico de concentração/concentração inibitória mínima (C_{max}/CIM), área sob a curva de concentração plasmática/ CIM (ASC/CIM) e tempo em que as concentrações permanecem acima do CIM ($T > CIM$), estes apresentam limitações como marcadores de eficácia clínica desses fármacos (Andes, 2006). Esta limitação está relacionada à utilização da CIM como parâmetro farmacodinâmico, que é determinada *in vitro* utilizando concentração constante do fármaco após período de incubação previamente estabelecido e não reflete as flutuações de concentração observadas no organismo após a administração do mesmo. Além disso, sabe-se que em concentrações abaixo da CIM os antifúngicos, assim como os antimicrobianos, têm atividade contra os microrganismos.

Neste contexto, a modelagem farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) é uma abordagem conceitualmente mais abrangente que pode auxiliar na determinação e otimização da posologia de antifúngicos em comparação com os índices PK/PD que foram recentemente estabelecidos (Schmidt *et al.*, 2008). Os modelos PK/PD são aplicados na simulação e previsão de efeito, assim como na otimização de posologias para diversos fármacos, através da combinação de parâmetros farmacocinéticos e propriedades farmacodinâmicas, que permitem uma correlação matemática entre os elementos da tríade concentração efetiva do fármaco, efeito farmacológico e tempo (Andes, 2006). Para que o modelo PK/PD seja desenvolvido, realizam-se estudos de avaliação do perfil farmacocinético (PK) do fármaco, administrando-se diferentes posologias e monitorando-se as concentrações plasmáticas obtidas e, muitas vezes, as concentrações livres no plasma ou no local de ação. Paralelamente, procede-se a avaliação farmacodinâmica em função do tempo (PD), após a utilização de diferentes posologias, em ensaios *in vitro* ou *in vivo*, para determinar o efeito obtido devido à variação de concentração do fármaco em estudo. Raros trabalhos na literatura, no entanto, modelaram a cinética e a dinâmica de antifúngicos através da modelagem PK/PD.

De posse dos dados de PK e PD, busca-se estabelecer a correlação matemática do perfil temporal dose-concentração-resposta. Sob condições de equilíbrio entre a concentração plasmática e a concentração no local de ação, a relação entre a concentração e o efeito pode ser descrita por modelos farmacodinâmicos tais como o modelo E_{max} e o modelo E_{max} -sigmoidal. O modelo E_{max} descreve o efeito do fármaco sobre a totalidade da faixa de concentrações obtidas após sua administração, pois considera um valor de efeito máximo (E_{max}) e um valor de concentração que produz 50% do efeito máximo (EC_{50}), o que representa, em outras palavras, a atividade intrínseca da substância e a potência da mesma, respectivamente. Esse modelo permite prever um efeito máximo, quando todos os receptores alvo na biofase são ocupados pelo fármaco, bem como a ausência de efeito, quando não há fármaco. O modelo E_{max} -sigmoidal é uma expansão do modelo E_{max} hiperbólico, sendo considerado o mais versátil dos modelos farmacodinâmicos. Neste caso, adiciona-se um parâmetro exponencial ao modelo E_{max} hiperbólico (fator de Hill), que permite o ajuste do modelo aos dados experimentais de forma mais adequada (Schmidt *et al.*, 2008).

Estudos empregando esta abordagem para antifúngicos, no entanto, só foram aplicados ao voriconazol por nosso grupo de pesquisa (Araújo, 2008) e outros autores (Li *et al.*, 2008), sendo necessária uma maior exploração do tema, no sentido de se comparar

a eficácia e possibilidade de indicações de ajuste posológico para outros fármacos da classe dos antifúngicos azólicos, como o fluconazol, que ainda é o antifúngico mais utilizado para tratamentos de candidiases sistêmicas.

Nesse contexto, o objetivo geral desse trabalho é estabelecer modelo PK/PD para o antifúngico fluconazol. Os objetivos específicos são:

- Adaptar e validar metodologia analítica por CL-EM/EM e CLAE/UV para doseamento do fluconazol em plasma, microdialisado de tecido e caldo de cultura;
- Determinar as concentrações totais de fluconazol no plasma de ratos saudáveis e infectados por *Candida albicans* e as concentrações livres renais, através de microdialise;
- Simular as concentrações livres teciduais renais do fluconazol, esperadas após administração de diferentes posologias, em modelo de infecção experimental *in vitro* contra diferentes espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) e avaliar os perfis de morte em função do tempo (*time-kill curves*);
- Determinar a correlação matemática entre o efeito antifúngico do fluconazol e as concentrações livres teciduais renais através de modelagem PK/PD.

1 Candidemia

A incidência de fungemia nosocomial, mais freqüentemente como resultado de infecção pelo gênero *Candida spp.*, tem aumentado dramaticamente nas últimas décadas, sendo a quarta causa de infecções deste tipo nos Estados Unidos (Bustamante, 2005). O aumento desta incidência tem sido atribuído a avanços da medicina moderna, como por exemplo, transplante de órgãos, uso de agentes quimioterápicos, de dispositivos de monitorização invasiva, nutrição parenteral, antimicrobianos de amplo espectro, e ventilação assistida, que prolongam a sobrevivência, mas ao mesmo tempo, colocam os pacientes em um alto risco de infecção fúngica (Fridkin & Jarvis, 1996; Edwards, 2005).

A taxa de mortalidade entre os pacientes com fungemia é elevada, variando entre 50% e 80% (Alonso-Valle *et al.*, 2003). Apesar dos estudos epidemiológicos realizados nos últimos anos indicarem um aumento de infecções por espécies de *Candida* não-*albicans*, especificamente *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, e *Candida krusei*, a grande maioria ainda é associada à infecção por *Candida albicans* (Abi-Said *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 2009). Este aumento de infecções causadas por espécies não-*albicans* deve-se principalmente ao uso proflático de antifúngicos, especialmente o fluconazol (Samra *et al.*, 2005). No Brasil, este quadro é similar, ocorrendo apenas um pequeno aumento na incidência de casos associados com a espécie *C. tropicalis* (Tabela 1) (França *et al.*, 2008).

Tabela 1. Percentual de espécies de *Candida* associadas a candidíases no Brasil*.

Microrganismo	Freqüência (%)
<i>Candida albicans</i>	59,0
<i>Candida tropicalis</i>	15,0
<i>Candida parapsilosis</i>	9,0
<i>Candida glabrata</i>	7,0
<i>Candida krusei</i>	2,0

*(Retirado de França *et al.*, 2008).

A candidemia é considerada uma forma de candidíase sistêmica, e ocorre antes do envolvimento de outros órgãos. A invasão da corrente sanguínea e posterior disseminação com múltiplas localizações são características de pacientes imunossuprimidos que desenvolvem infecção fúngica (Edwards, 2005).

A manifestação clínica de candidemia é caracterizada por febre alta a 39-40 ° C, embora existam casos de febre ligeira, estado afebril e até mesmo hipotermia, taquicardia acompanhada de crise persistente, por vezes, calafrios e erupções cutâneas no tronco e membros, que se assemelham a uma reação anafilática (Gomez *et al.*, 2010).

Como acontece com qualquer doença infecciosa, o diagnóstico etiológico correto e precoce é essencial para estabelecer o tratamento adequado e, assim, melhorar o prognóstico do paciente. Tem sido considerado como um diagnóstico de candidíase disseminada, a demonstração de duas hemoculturas positivas em um intervalo de 24 horas por punção percutânea distante de um local colonizado. No entanto, alguns autores discordam deste critério, considerando suficiente para o diagnóstico de candidemia uma única cultura positiva no sangue (Pfaller & Diekema, 2007).

A presença exclusiva ou o predomínio de uma espécie de *Candida* em lesões assume, em geral, significado patológico importante. Apesar de qualquer órgão poder ser afetado, os rins são os mais freqüentemente envolvidos (Lacaz *et al.*, 1991). Por razões desconhecidas, a *Candida spp.* tem predileção pelos rins e este órgão pode ser severamente lesado, resultando em falência renal.

Essas características, associadas à virulência da *Candida spp.*, têm impulsionado os estudos quanto à fisiopatologia da doença e à otimização da estratégia de tratamento, através do desenvolvimento de modelos de infecção experimental *in vivo* e *in vitro*, da determinação dos parâmetros farmacocinético-farmacodinâmicos preditivos da eficácia antifúngica e da modelagem PK/PD de antifúngicos.

2 Fluconazol

2.1 Características químicas

O fluconazol [2-(2,4,-difluorophenyl)-1,3-bis(1H- 1, 2,4,-triazol-1-yl)propan-2-ol] (Figura 1) é um agente antifúngico azólico descoberto por Richardson e colaboradores nos laboratórios Pfizer® (Richardson *et al.*, 1990). Devido a grande necessidade de antifúngicos de uso oral este fármaco foi rapidamente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1990.

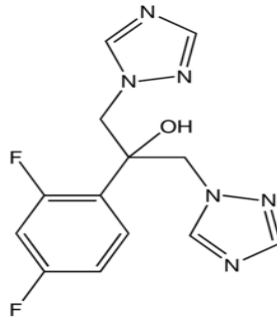


Figura 1. Estrutura química do fluconazol, antifúngico azólico.

2.2 Mecanismo de Ação

Assim como outros antifúngicos azólicos, o fluconazol exerce seu efeito primariamente através da inibição da 14- α -esterol desmetilase (P-450_{DM}), uma enzima dependente do citocromo P-450, responsável pela conversão do lanosterol em 14- α -desmetil-lanosterol em uma das etapas de biossíntese do ergosterol. O ergosterol é um componente essencial da membrana do fungo, regulando a fluidez, a permeabilidade e a atividade das enzimas associadas à membrana (Hughes & Beggs, 1987).

A inibição da P-450_{DM} causa não somente a depleção do ergosterol e, conseqüentemente, a perda da integridade e funcionalidade da membrana celular fúngica, como também desencadeia o acúmulo de precursores de ergosterol tóxicos, incluindo o esqualeno, o zimosterol, o lanosterol, o 4,14-dimetilzimosterol e o 2-4 metilenodihidrolanosterol (Sanati, 1997). O efeito global consiste na inibição da replicação fúngica, sendo considerado um fármaco fungistático.

2.3 Propriedades farmacocinéticas

O fluconazol é extensivamente absorvido, com uma biodisponibilidade oral superior a 80% em humanos, podendo ser administrado tanto pela via oral quanto pela via intravenosa. O pico de concentração plasmática é atingido entre 1 e 2 horas em humanos sadios e sua absorção gastrintestinal não é modificada pela diferença de pH gástrico. Sua ligação a proteínas plasmática é de aproximadamente 11% e a maior parte da dose administrada é excretada inalterada na urina (60 a 75%). Possui uma excelente

distribuição tecidual tanto em indivíduos sadios quanto em pacientes com meningite (Debruine, 1997).

A farmacocinética do fluconazol é bem descrita na literatura tanto para animais quanto para seres humanos (Humphrey *et al.*, 1985). A farmacocinética do fluconazol mostrou-se linear em camundongos após a administração de doses de 1 e 40 mg/kg. Os parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração oral do fármaco a quatro espécies animais, estimados pelo modelo de um compartimento aberto, estão mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros farmacocinéticos do fluconazol em diversas espécies animais.

Parâmetros	Camundongo (n = 5)	Rato (n = 5)	Cão (n = 2)	Homem (n = 4)
Dose (mg/kg)	1	10	20	1
C _{max} (µg/mL)	0,7	0,6	1,0	1,4
t _{1/2} (h)	5	4	15	22
ASC _{0-t} (µg·h/mL)	8,5	152	268	43
Vd (L/kg)	0,9	0,8	0,8	0,7
CL (mL/min/kg)	2	2,2	0,62	0,4

(Retirado de Humphrey *et al.*, 1985).

2.4 Propriedades Farmacodinâmicas

Os testes de susceptibilidade de diferentes espécies de *Candida* frente ao fluconazol utilizando a metodologia precozinada no documento M27-A3 do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) classificam os fungos como suscetíveis se a CIM é menor do que 8 µg/mL, dose dependente suscetíveis se o valor da CIM está entre 16 e 32 µg/mL e resistente quando a CIM é maior do que 64 µg/mL. Alguns destes estudos estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Atividade *in vitro* do fluconazol contra diferentes espécies de *Candida*

Espécies de <i>Candida</i>	N° de isolados clínicos testados	Faixa de CIM ₉₀ (µg/mL)	Resistentes (%)	Referências
<i>C. albicans</i>	7725	0,12 – 8	0,06	Ghannoum & Rice, 1999 Diekema <i>et al.</i> , 2002 Pfaller & Diekema, 2004
<i>C. glabrata</i>	1996	2 – 32	9,0	Ghannoum & Rice, 1999 Diekema <i>et al.</i> , 2002 Pfaller & Diekema, 2004
<i>C.parapsilosis</i>	1623	0,25 – 8	0,5	Ghannoum & Rice, 1999 Diekema <i>et al.</i> , 2002 Pfaller & Diekema, 2004
<i>C. tropicalis</i>	1253	0,25 – 32	2,0	Ghannoum & Rice, 1999 Diekema <i>et al.</i> , 2002 Pfaller & Diekema, 2004

CIM₉₀ = Concentração Inibitória Mínima para inibição do crescimento de 90% das amostras testadas. (Adaptado de Pfaller *et al.*, 2006).

Como se pode perceber nos estudos mostrados na Tabela 3, o número de isolados clínicos de diferentes espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol é baixo, sendo este o antifúngico de primeira escolha para o tratamento de candidíase sistêmica, mesmo após 15 anos de uso (Charlie *et al.*, 2006).

Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos têm sido utilizados com frequência para comparar antimicrobianos, já que estas medidas são características dos fármacos e podem ser utilizadas para escolha do melhor agente terapêutico para uma determinada infecção (Ebert, 2004). Os índices PK/PD empregados para antifúngicos, em parte se assemelham aos aplicados na análise de antibacterianos.

Para o estabelecimento dos índices PK/PD, a CIM é relacionada a parâmetros farmacocinéticos como a área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo (ASC), pico de concentração plasmática ($C_{máx}$) e tempo (T) (Figura 2). Deste modo, os índices são: ASC/CIM e $C_{máx}/CIM$ para fármacos cujo efeito é concentração dependente e $T > CIM$ para fármacos com efeito tempo dependente. Estes três índices têm sido tradicionalmente empregados para descrever a relação entre a exposição ao fármaco e o efeito do tratamento tanto antimicrobiano quando antifúngico, mais recentemente.

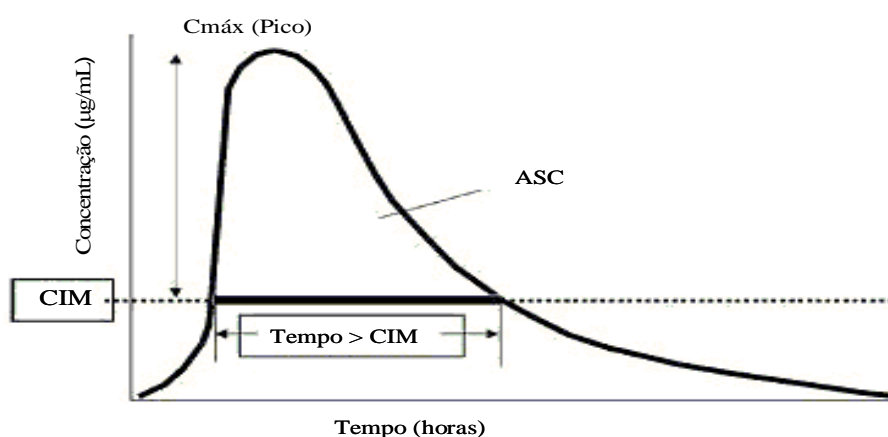


Figura 2. Índices farmacocinéticos/farmacodinâmicos (PK/PD) empregados na avaliação de eficácia de antimicrobianos (Adaptado de Andes, 2004).

Quando a morte do microrganismo é aumentada pelo aumento da dose, o antifúngico é considerado concentração dependente. Nessa situação o índice PK/PD que prevê a eficácia clínica pode ser tanto a ASC/CIM quanto o $C_{m\acute{a}x}/CIM$. Neste grupo de fármacos estão incluídos os antifúngicos poliênicos, como a anfotericina B, as equinocandinas, a caspofungina, e os agentes azólicos, como o fluconazol e o voriconazol (Andes, 2004).

Com outros grupos de fármacos a atividade antifúngica é aumentada não em função do aumento das concentrações plasmáticas totais, mas sim pelo aumento do tempo de exposição ao fármaco, sendo então definidos como antifúngicos tempo dependentes, ou concentração independentes, descritos pelo índice PK/PD $T > CIM$, estando incluída neste grupo a flucitocina (Andes, 2004).

O índice PK/PD que melhor previu o desempenho do fluconazol frente à candidíase sistêmica disseminada em murinos foi a ASC/MIC (Louie *et al.*, 1998). Porém, a falta de correlação entre o resultado clínico e os obtidos nos testes de suscetibilidade ocasiona muitas dificuldades no tratamento de infecções fúngicas invasivas, envolvendo tratamentos imprecisos e muitas vezes controversos (Doods *et al.*, 2000).

O principal parâmetro farmacodinâmico utilizado nos índices PK/PD empregados para antifúngicos é a CIM, que reflete a menor concentração de fármaco capaz de inibir o crescimento fúngico visível em um experimento padronizado. Os métodos para determinação da CIM em antifúngicos, no entanto, são diferentes daqueles empregados para a maioria dos agentes antimicrobianos, sendo que as técnicas variam entre os grupos de antifúngicos (Doods *et al.*, 2000). Para antifúngicos azólicos, foi preconizado o uso da técnica de microdiluição com o caldo RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), tamponados com MOPS (Ácido 2-(N-morfolino)-propanossulfônico), pH 5,0. Este método tem demonstrado boa reprodutibilidade, possibilitado uma correlação entre resultados *in vitro* e a resposta clínica para alguns antifúngicos (Aller *et al.*, 2000)

Apesar das vantagens da classificação dos antifúngicos através dos índices PK/PD, que possibilita uma estratégia para aumentar a eficácia dos tratamentos com estes fármacos, a utilização dos índices não permite a descrição temporal do efeito antifúngico. Além disso, uma avaliação de efeito

que considera a CIM como parâmetro farmacodinâmico tem uma grande limitação, uma vez que não permite a observação do comportamento de crescimento microbiano frente a concentrações flutuantes, mais próximas da situação real *in vivo*, nem frente a concentrações sub-inibitórias, que podem gerar o desenvolvimento de resistência. Deste modo, novas abordagens têm sido testadas na literatura como a modelagem PK/PD, bastante difundida para fármacos antimicrobianos.

Nos últimos anos, além da utilização da CIM, a avaliação da atividade de antimicrobianos e também a de antifúngicos tem sido feita pela investigação das curvas de morte bacteriana ou fúngica por tempo (*time-kill curves*), que podem ser modeladas matematicamente (abordagem PK/PD) tanto em função do tempo como em função da concentração plasmática e/ou tecidual do fármaco. Além de se poder avaliar o efeito farmacológico da fração ativa no sítio de ação, nas *time kill curves* também se pode mimetizar a taxa de eliminação do fármaco, gerando valores de parâmetros PK-PD mais fidedignos (Schuck & Derendorf, 2005).

Esta abordagem está sendo usada para orientar a seleção de candidatos a fármaco potenciais além de fornecer uma justificativa científica para a seleção de regimes posológicos, podendo, assim, aumentar a eficácia e reduzir a probabilidade do surgimento de fármacos resistentes (Meibohm & Derendorf, 2002). A *Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Medicines Agency* (EMA) defendem o uso de modelos *in vitro* e *in vivo* para caracterizar as propriedades PK/PD de antimicrobianos, podendo-se prever a eficácia do candidato a fármaco nos estágios iniciais do processo de desenvolvimento (Budha *et al.*, 2009).

3. Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica

Por muito tempo, a farmacodinâmica (PD) e a farmacocinética (PK) foram consideradas como disciplinas separadas. Enquanto a farmacocinética estuda a variação da concentração do fármaco em diferentes locais do organismo em função do tempo, a farmacodinâmica descreve a relação entre o efeito e a concentração do fármaco no sítio de ação. A modelagem farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) surgiu para ligar as duas disciplinas

clássicas da farmacologia. Esta modelagem pode ser definida como a descrição matemática desta relação, a qual permite prever a variação do efeito com a variação da concentração do fármaco no organismo, em função do tempo (Derendorf & Hochhaus, 1995; Derendorf & Meibohm, 1999; Mager & Jusko, 2003).

Os modelos farmacodinâmicos mais utilizados para descrever a relação concentração versus efeito do fármaco são os modelos E_{max} e E_{max} -sigmoidal. O modelo E_{max} descreve o efeito do fármaco em relação à variação da concentração através de uma relação hiperbólica e o modelo de E_{max} -sigmoidal, que é uma variação do primeiro, é utilizado quando a curva concentração-efeito não pode ser descrita de forma hiperbólica simples (Mouton *et al.*, 2005):

$$E = \frac{E_{max} \cdot C^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C^\gamma} \quad \text{Eq. 1}$$

onde E é o efeito do fármaco; E_{max} é o efeito máximo obtido pelo fármaco; C é a concentração do fármaco; EC_{50} é a concentração do fármaco que produz 50% do efeito máximo; γ é o fator de Hill, que influencia a curvatura da curva efeito-concentração.

O expoente γ é um fator que, teoricamente, reflete o número de moléculas do fármaco que se liga a um receptor específico. Se n for um, o modelo E_{max} será hiperbólico; se for diferente de um, será sigmoidal.

Ao contrário da utilização da CIM, que é um parâmetro estante nos índices PK/PD, obtido com uma concentração fixa do fármaco, os modelos PK/PD estabeleceram três novos parâmetros para a avaliação do efeito antimicrobiano sobre o microrganismo: k, k_{max} e EC_{50} . Estes parâmetros servem para descrever todo o perfil de efeito observado devido à flutuação do fármaco no local de infecção, decorrente da eliminação do mesmo do organismo.

O emprego de modelos E_{max} para descrever o curso temporal do efeito de antimicrobianos iniciou com a investigação de antibióticos β -lactâmicos. O modelo de E_{max} modificado foi utilizado por Nolting e colaboradores em 1996,

para avaliar o efeito bactericida da piperacilina sobre a *Escherichia coli in vitro*. O desenvolvimento desse modelo foi realizado a partir de simulações, utilizando modelo de infecção experimental *in vitro*, do perfil de concentração tecidual livre esperado em tecido muscular de humanos após administração *i.v. bolus* de piperacilina. Este modelo já foi empregado com sucesso para a avaliação de antibióticos β -lactâmicos em monoterapia (De La Penã *et al.*, 2004) e em associação com inibidores de β -lactamase (Dalla Costa *et al.*, 1998). Os antimicrobianos quinolônicos também foram modelados com sucesso usando este modelo, como ciprofloxacino por Delacher e colaboradores (2000), levofloxacino e gatifloxacino, por nosso grupo de pesquisa (Tasso *et al.*, 2011).

Uma importante alteração para o modelo E_{max} -sigmoidal foi proposta por Mouton e colaboradores (1997), baseando-se no fato de que modelos *in vitro* apresentam fatores limitantes do crescimento do microrganismo como, por exemplo, nutrientes e espaço. Após a etapa de crescimento exponencial, uma cultura bacteriana atinge um platô em que a velocidade de multiplicação das bactérias diminui. Desse modo, foi proposta pelos autores a adição de um termo na equação de E_{max} modificado utilizada para descrever a atividade frente a microrganismos, representado por N_{max} , que indica o maior número de microrganismos que uma cultura *in vitro* suporta antes de entrar na fase de platô.

$$\frac{dN}{dt} = \left\{ \left[k \cdot \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) \right] - \frac{k_{max} \cdot C_t^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C_t^\gamma} \right\} \cdot N \quad \text{Eq. 2}$$

onde dN/dt é o número de microrganismo no frasco de cultura em função do tempo, k é a constante de crescimento do microrganismo na ausência do fármaco, N é o número de microrganismos presente no inóculo inicial e C_t é a concentração do fármaco no sítio de ação.

Este modelo foi utilizado com sucesso em estudos empregando cefalosporinas (Mouton *et al.*, 1997), quinolonas como norfloxacino (Palma, 2003) e isoniazida (Budha *et al.*, 2009).

O Modelo PK/PD de E_{max} -modificado descrito foi aplicado com sucesso em nosso grupo (Araújo, 2008), onde o efeito do antifúngico voriconazol foi

modelado frente a *Candida albicans* e *C. krusei*, e os resultados demonstraram que este fármaco é mais eficaz contra a *C. krusei*, já que houve diferença estatística apenas no valor do parâmetro $k_{m\acute{a}x}$.

Este modelo matemático também foi empregado por Li e colaboradores (2008) para modelar o efeito antifúngico do voriconazol frente a diferentes espécies de *Candida* e por Venisse e colaboradores (2008) para modelar o efeito do fluconazol e da caspofungina contra *Candida albicans* utilizando concentrações do fármaco múltiplas de 10 em modelo de infecção *in vitro*, visando mostrar a efetividade dos modelos PK/PD para descrever o efeito fungistático do fluconazol e fungicida da caspofungina. Os autores concluíram que modelos PK/PD devem ser utilizados para otimizar o uso de antifúngicos.

Após vasta busca em banco de dados, não foram encontrados outros estudos na literatura empregando a abordagem PK/PD para avaliar e prever o efeito de fármacos antifúngicos.

4 Microdiálise

Na modelagem PK/PD de antimicrobianos e antifúngicos, em geral, são utilizadas concentrações totais ou livres plasmáticas como indicadores das concentrações do fármaco no local da infecção. As concentrações livres de fármacos no fluido intersticial, no entanto, são as responsáveis pela resposta farmacológica e estas nem sempre são descritas pelas concentrações plasmáticas totais ou livres, não ligadas a proteínas.

Visando a determinação do perfil de concentração livre intersticial de fármacos para incorporar na modelagem PK/PD, a microdiálise (MD) *in vivo* tem encontrado importantes aplicações no campo da farmacocinética, especialmente na investigação dos processos de metabolismo e distribuição (Muller *et al.*, 2004). A técnica de microdiálise também pode ser utilizada para uma avaliação comparativa da penetração de fármacos em tecidos saudáveis e infectados, permitindo, assim, determinar diferenças de distribuição devidas à infecção (Joukhadar *et al.*, 2001 e Brunner & Derendorf, 2006).

Através desta técnica, originada na década de 60 para a avaliação de neurotransmissores, pode-se acessar a fração livre do fármaco, através do implante de uma sonda de diálise no tecido ou órgão de interesse, a qual é

constantemente irrigada com um líquido de perfusão compatível, com fluxo constante e controlado. Na porção terminal da sonda situa-se uma membrana semipermeável, que obedece aos princípios da difusão passiva, a qual é mantida constantemente sob condição *sink*. Como somente substâncias de baixo peso molecular são difundidas através da membrana, esta técnica permite determinar as concentrações livres da substância em estudo uma vez que apenas a fração não ligada a proteínas presentes no líquido intersticial sofrerá o processo de difusão através da membrana. As substâncias difundidas são coletadas na outra extremidade da sonda, para posterior análise (Johansen *et al.*, 1997; Chaurasia *et al.*, 2007).

Em uma avaliação farmacocinética utilizando a microdiálise, devido o experimento se desenvolver em condição *sink*, o conhecimento da recuperação das sondas torna-se crucial para a determinação da real concentração do fármaco no tecido em estudo. Os testes de recuperação devem ser realizados *in vitro*, para se escolher as melhores condições experimentais, e *in vivo*, antes dos experimentos, para garantir a adequabilidade do uso das sondas de microdiálise (Plock & Kloft., 2005; Chaurasia *et al.*, 2007).

A avaliação da penetração renal de voriconazol, outro antifúngico triazólico, utilizando microdiálise, foi realizada pelo nosso grupo de pesquisa, em ratos sadios e infectados por *Candida albicans* e *Candida krusei*, tendo sido comprovado que a penetração tecidual desse fármaco não se altera em função do processo de infecção (Araujo *et al.*, 2009). Como o voriconazol é um fármaco moderadamente lipofílico (log P = 1,8) que se liga às tubulações da sonda de microdiálise, foi necessário realizar estudos prévios à experimentação animal para determinação da recuperação relativa das sondas visando corrigir as concentrações coletadas no microdialisado (Araújo *et al.*, 2008).

A distribuição tecidual do fluconazol, através do uso de microdiálise, foi estudada no cérebro de ratos sadios por Yang e colaboradores (1996) após a administração de fluconazol pela via intravenosa nas doses de 10 e 20 mg/kg (n = 6/grupo). Os autores concluíram que o fluconazol se distribui rapidamente pelo cérebro com um fator de penetração médio neste tecido de aproximadamente 0,6.

Xavier e colaboradores (2003) avaliaram a concentração do fluconazol na derme de ratos saudáveis após a administração i.v. *bolus* de dose de 10 mg/kg, mostrando que as concentrações plasmáticas e os níveis de fluconazol na derme destes animais foram praticamente iguais durante todo o experimento.

Em 2011, Mauric e colaboradores administraram 6 mg/kg de fluconazol a ratos saudáveis e com inflamação sistêmica induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e verificaram a concentração do antifúngico no pulmão e no músculo de animais saudáveis e em tecidos inflamados com o uso da microdiálise, indicando que a relação pulmão/plasma é maior do que 1 tanto nos animais saudáveis quanto nos doentes.

O conjunto desses estudos mostrou que o fluconazol possui uma alta penetração tecidual e, além disso, a inflamação não altera o perfil de distribuição deste fármaco no músculo e pulmão.

Com base no que foi exposto até o presente momento e considerando-se: (i) a elevada incidência de candidíase no Brasil e no mundo; ii) a inexistência de bons parâmetros norteadores para a otimização do tratamento farmacológico dessas infecções; iii) o grande uso do fluconazol para o combate a candidíase; iv) o histórico de aplicação com sucesso da modelagem PK/PD para a simulação de regimes posológicos não testados na área de antimicrobianos, o objetivo do presente projeto é aplicar essa estratégia para avaliar o efeito do fluconazol frente as espécies de *Candida* mais prevalentes no Brasil (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*), através da avaliação do curso do efeito em função do tempo. Além disso, neste trabalho será avaliada a concentração do fluconazol nos rins de ratos Wistar saudáveis e infectados por *C. albicans* visando investigar se a infecção fúngica sistêmica afeta a penetração do fármaco no seu tecido alvo.

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados a seguir na forma de três artigos, distribuídos em capítulos, sendo um artigo em fase de elaboração, a ser submetido para publicação, um submetido e outro artigo publicado em periódico internacional.

**CAPÍTULO 2. LC/MS-MS Method for Pharmacokinetic Investigation of the
Antifungal Fluconazole**

**LC/MS-MS Method for Pharmacokinetic Investigation of the Antifungal
Fluconazole in Rodents**

Francine J. Azeredo^{a,*}, Flávia de T. Uchôa^b, Teresa Dalla Costa^{a,b}

^a*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de
Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil;*

^b*Centro Bioanalítico de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Brazil*

Manuscrito submetido à Revista Chromatographia

*Corresponding author:

Francine Johansson Azeredo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Av. Ipiranga, 2752 - Porto Alegre - RS - 90610-000, Brazil.

E-mail address: francinej@gmail.com

Phone: +55 51 3308 5215

Fax: +55 51 3308 5437

Abstract

A fast, sensitive, and specific LC-MS/MS method for determination of fluconazole (FCZ) in rat plasma has been developed and validated. FCZ was extracted from rat plasma by liquid-liquid extraction and their detection was conducted by positive electrospray ionization (ESI+) in multiple reaction monitoring (MRM) mode, monitoring the transitions 307.01 > 219.6. The method was linear in the plasma concentration range 10–2.000 ng/ mL, was validated according to FDA guideline and is suitable to support pharmacokinetic investigation with this drug. In comparison with other methods described for FCZ quantification this method presents the advantages of high sensitivity, requirement of small sample volume, fast running time, carry over and matrix effects analysis.

Keywords: Fluconazole; LC-MS/MS, Bioanalytical Method Validation, Liquid-liquid Extraction, and Pharmacokinetics.

**CAPÍTULO 3. Comparision of renal penetration of fluconazole in healthy
and *Candida albicans* infected Wistar rats**

Comparison of renal penetration of fluconazole in healthy and *Candida albicans* infected Wistar rats

Antimicrob. Agents Chemother. 2012, 56(11):5852. DOI: 10.1128/AAC.01323-

12

Francine Johansson Azeredo; Bibiana Verlindo de Araújo, Sandra Elisa Haas, Bruna Torres; Maiara Pigatto, Cristiane de Andrade, Teresa Dalla Costa*

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

*Corresponding author:

Teresa Dalla Costa

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Av. Ipiranga, 2752 - Porto Alegre - RS - 90610-000, Brazil.

E-mail address: teresadc@farmacia.ufrgs.br

Phone: +55 51 3308 5418

Fax: +55 51 3308 5437

ABSTRACT

The aims of this study were to evaluate free levels of fluconazole (FCZ) in the kidney of healthy and *Candida albicans* infected Wistar rats using microdialysis and to establish the relationship between free renal and total plasma levels in both conditions. Microdialysis recoveries were determined *in vitro* by dialysis and retrodialysis and *in vivo* by retrodialysis. The recovery was around 50%, independent on the method, drug concentration or condition (*in vitro* or *in vivo*) used. FCZ kidney penetration in healthy and infected rats was investigated after administration of 10 mg/kg i.v. or 50 mg/kg orally ($n = 6/\text{group}$) and blood and microdialysate samples harvesting at predetermined time points up to 24 and 18 h, respectively. There were no statistical differences between the area under the free concentration-time curve ($\text{AUC}_{0-\infty}$) in plasma and in tissue for either healthy or infected groups for the same dose regimen investigated. The antifungal tissue penetration was similar for both doses and all conditions investigated (ranging from 0.77 to 0.84). Unbound fraction of FCZ was concentration-independent ($86.0 \pm 2.0\%$), allowing the prediction of free renal levels using pharmacokinetic parameters obtained from total plasma fitting. The results showed that free renal and free plasma levels are similar in healthy and *C. albicans* systemically infected rats. Therefore, free plasma levels are a good surrogate to estimate free FCZ renal concentrations in systemic candidiasis and can be used to optimise dosing regimens for this drug.

Keywords: Fluconazole; Microdialysis; *In vitro* and *in vivo* recoveries; *Candida albicans*; Renal penetration.

CAPÍTULO 4. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model of Fungistatic Effect of Free Renal Levels of Fluconazole against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis*

Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model of Fungistatic Effect of Free Renal Levels of Fluconazole against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida Parapsilosis*

Francine Johansson Azeredo, Bibiana Verlindo de Araujo, Teresa Dalla Costa *

*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil;*

Manuscrito a ser submetido a Revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy

*Corresponding author:

Teresa Dalla Costa

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Av. Ipiranga, 2752 - Porto Alegre - RS - 90610-000, Brazil.

E-mail address: teresadc@farmacia.ufrgs.br

Phone: +55 51 3308 5418

Fax: +55 51 3308 5437

ABSTRACT

The goal of this work was to compare the pharmacological properties of fluconazole against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* ATCC strains by pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modeling of the time–kill curves employing an E_{\max} model. An *in vitro* infection model was used to simulate free kidney fluctuating concentrations expected in humans after multiple dosing regimens of fluconazole or constant concentrations multiples of the minimum inhibitory concentration (MIC) against the three strains. PK/PD parameters estimated by modeling were compared. Fluconazole EC_{50} was statistically smaller against *C. albicans* ($4.4 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$) than against *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, respectively ($8.1 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$ and $8.3 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$) when simulating multiple dosing regimens as well as constant concentrations (EC_{50} , *C. albicans* = $3.5 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$; EC_{50} , *C. parapsilosis* = $6.1 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$; EC_{50} , *C. tropicalis* = $6.5 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$) ($\alpha = 0.05$). The maximum killing rate constant (k_{\max}) was statistically similar for the *Candida spp.* (approximately 0.4 h^{-1}) and always statistically smaller than the natural growth rate k_0 (approximately 2 h^{-1}) ($\alpha = 0.05$). The PK/PD model was able to describe the fungistatic effect of fluconazole *in vitro* against the three *Candida spp.* investigated. Fluconazole showed higher potency against *C. albicans* than against *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* and equivalent efficacy against these yeasts. The model can be used to simulate alternative regimens, to compare its pharmacological effect with other antifungals and to optimize therapy to treat systemic candidiasis.

Keywords: Fluconazole; PK/PD Modeling, *in vitro* Model of Infection, and Fungistatic Effect

As candidemias ainda ocupam uma posição de destaque entre as causas de morbimortalidade no ambiente hospitalar, apresentando uma incidência variável no mundo, na faixa de 0,28- 0,96 casos para cada 1000 admissões hospitalares nos Estados Unidos (Wisplinghoff *et al*, 2004) e 0,20- 0,38 casos para cada 1000 admissões na Europa (Tortorano *et al*, 2004), com uma mortalidade na ordem de 40% (Bidart, 2004). No Brasil esse panorama é ainda mais preocupante, com uma incidência de 2,49 casos para cada 1000 admissões hospitalares, valor muito superior aos encontrados em estudos nos EUA e na Europa, com uma mortalidade geral associada de 54% (Colombo *et al*, 2006). No que diz respeito à etiologia das infecções, as espécies mais prevalentes são *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

Diferentes fatores têm contribuído para essa elevada taxa de incidência e mortalidade, destacando-se entre eles a dificuldade de diagnóstico, limitações no tratamento e, principalmente a falta de consenso quanto ao estabelecimento dos parâmetros norteadores das posologias utilizadas.

Neste trabalho foi utilizada a modelagem farmacocinética-farmacodinâmica (PK/PD) para uma melhor compreensão da interação entre as três diferentes espécies mais prevalentes de *Candidas* e o antifúngico fluconazol, já que este é o fármaco de escolha para o tratamento das infecções sistêmicas causadas por estes microrganismos. Diferentemente do que ocorre com os antifúngicos, esta abordagem vem sendo utilizada com sucesso para o estudo da interação entre bactérias e diferentes antimicrobianos (Tasso *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2012).

Para que o modelo PK/PD seja desenvolvido, realizam-se estudos de avaliação do perfil farmacocinético (PK) do fármaco, administrando-se diferentes posologias e monitorando-se as concentrações plasmáticas obtidas, totais e livres. No caso dos antifúngicos, as concentrações livres de fármacos no fluido intersticial são as responsáveis pela resposta farmacológica, fungistática ou fungicida. Nesse trabalho, avaliou-se o perfil de concentração livre tecidual do fluconazol nos rins, tecido alvo das *Candidas spp.*, em ratos Wistar sadios e infectados com *Candida albicans* através do uso da técnica microdiálise, a qual permite a coleta de amostras na biofase, sem alterar o perfil cinético ou dinâmico do fármaco.

Para essa etapa do estudo, foi necessário realizar o desenvolvimento e a validação de metodologias analíticas para a quantificação do fluconazol em plasma e no microdialisado renal. As amostras de microdialisados foram quantificadas por CLAE com detecção por UV em um comprimento de onda de 210 nm. Para a quantificação do

fluconazol nas amostras de plasma foi necessária a detecção por espectrometria de massas após a extração líquido-líquido do fármaco nesta matriz biológica mais complexa.

Após a correção da recuperação das sondas de microdiálise, um pré-requisito necessário sempre que ocorre a utilização desta técnica, avaliou-se a penetração renal do fluconazol em ratos saudáveis e infectados sistemicamente por *C. albicans* após a administração de 10 mg/kg pela via intravenosa e de 50 mg/kg pela via oral. Os parâmetros farmacocinéticos plasmáticos e renais do fluconazol obtidos após a avaliação compartimental dos perfis individuais não foram estatisticamente diferentes nos animais saudáveis e infectados, indicando que a candidíase sistêmica não altera a penetração renal do fármaco e que há uma boa correlação entre as concentrações livres renais e a previsão das mesmas feita utilizando os parâmetros determinados pela avaliação dos perfis plasmáticos totais. Além disso, pode-se verificar que o antifúngico fluconazol possui uma alta penetração renal nas diferentes condições utilizadas neste trabalho.

Assumindo-se que a capacidade de previsão das concentrações livres renais do fluconazol a partir dos parâmetros farmacocinéticos determinados pela modelagem dos dados plasmáticos de roedores também pode ser observada em humanos, utilizou-se dados de literatura do fluconazol em humanos (Koks *et al.*, 1996; Pereira *et al.*, 2004) para prever as concentrações livres renais esperadas para o fármaco após a administração de diferentes posologias.

Uma das vantagens do desenvolvimento de modelos PK/PD para antifúngicos é o fato de que o efeito a ser avaliado é a morte do microrganismo, o que pode ser feito com experimentos *in vitro*, através da determinação das curvas de morte por tempo, sendo a eficácia do fármaco avaliada pela contagem de células viáveis no meio de cultura após a exposição ao fármaco em estudo.

No presente trabalho, os perfis de concentração livre teciduais obtidos após o uso de posologias do fluconazol tradicionalmente utilizadas na clínica (200, 400 e 800 mg, q8h, q12h e q24h) e concentrações múltiplas da CIM foram simulados *in vitro* contra *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, para a avaliação do efeito deste antifúngico em função do tempo. A modelagem PK/PD foi realizada com auxílio de programa de computador específico (Scientist[®]) utilizando modelo farmacodinâmico de E_{max} -sigmoidal, o qual permitiu determinar parâmetros como efeito máximo do antifúngico frente ao microrganismo (E_{max}) e concentração necessária para causar 50% do efeito máximo (CE_{50}).

Os valores médios dos três parâmetros PK/PD resultantes da modelagem das curvas de morte fúngicas (k_0 , k_{max} e CE_{50}) mostram que o fluconazol é igualmente eficaz

contra *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, independente do regime posológico simulado ($\alpha = 0,05$) e mais potente contra *C. albicans* do que frente as outras duas espécies de *Candida spp.* utilizadas neste trabalho ($\alpha = 0,05$). Os parâmetros PK/PD do fluconazol também foram estatisticamente semelhantes quando as cinco diferentes concentrações, múltiplas da concentração inibitória mínima (CIM), foram simuladas no sistema *in vitro* em comparação com os parâmetros obtidos após a simulação de regimes posológicos utilizadas na clínica, indicando que o modelo é consistente e gera os mesmos parâmetros, independente da condição experimental (concentração constante ou concentração flutuante) simulada *in vitro*.

Ao comparar os parâmetros PK/PD médios do fluconazol obtidos neste estudo com os do voriconazol, obtidos em trabalho anterior do nosso grupo frente a *C. albicans* (Araújo, 2008), pode-se verificar que ambos os fármacos foram igualmente eficazes e potentes.

Desta maneira, pode-se concluir que a modelagem PK/PD do antifúngico fluconazol através do uso do modelo de Emax sigmoidal utilizado neste estudo descreveu adequadamente o efeito fungistático do fluconazol frente à *Candida spp.* seguindo diferentes regimes posológicos. O modelo obtido neste trabalho poderá ser utilizado para prever o efeito deste antifúngico em função do tempo para posologias não avaliadas experimentalmente, possibilitando uma indicação de ajuste posológico, além de poder ser realizada uma comparação de eficácia entre diferentes antifúngicos.

Resumindo as principais conclusões desse trabalho são:

- método bioanalítico para quantificação do fluconazol em plasma de ratos Wistar por CLAE/EM-EM foi desenvolvido e validado de acordo com o preconizado no guia do FDA (*Food and Drug Administration*);

- as constantes híbridas obtidas da modelagem dos perfis de concentração plasmática total são capazes de prever as concentrações livres renais do antifúngico fluconazol, desde que a taxa de ligação a proteínas plasmáticas seja conhecida;

- a infecção por *Candida albicans* por via sistêmica não altera a penetração renal do fluconazol em ratos Wistar;

- o modelo PK-PD sigmoidal utilizado neste trabalho foi capaz de descrever adequadamente o efeito fungistático do fluconazol frente a *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.

- as três cepas de *Candida* estudadas geraram valores estatisticamente similares dos parâmetros PK-PD velocidade de geração fúngica (K_0) e efeito fungistático máximo

($K_{m\acute{a}x}$) após modelagem matemática, indicando que o antifúngico fluconazol possui eficácia equivalente frente a esses fungos.

- a concentração necessária para causar 50% do efeito fungistático máximo (CE_{50}) foi estatisticamente menor frente a *C. albicans* do que frente a *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, indicando que o fluconazol é mais potente contra a espécie *albicans* do que contra a outras *Candida spp.* avaliadas neste trabalho.

1. ABI-SAID, D., ANAISSIE, E., UZUN, O., RAAD, I., PINCOWSKI, H., VARTIVARIAN, S. *The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different Candida species.* **Clin Infect Dis**, v. 8: 1122—8, 1999
2. ALLER, A. I.; MARTIN-MAZUELOS, E.; LOZANO, F. *et al.* *Correlation of fluconazol MICs with clinical outcome in cryptococcal infection.* **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.44, p. 1544-1548, 2000
3. Alonso-Valle H, Acha O, Salesa R, García Palomo JD, Mariñas MC. *Fungemia in a tertiary care hospital, 1995-2000.* **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v. 22, p. 254-7, 2003.
4. Andes, D. *In vivo pharmacodynamics of antifungal drugs in treatment of candidiasis.* **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 47, n. 4, p. 1179-1186, 2004.
5. ANDES, D. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antifungals.* **Infect Dis Clin N Am** 20: 679–697, 2006.
6. Araujo BV, Silva CF, Haas SE, Dalla Costa T. *Microdialysis as a tool to determine the free kidney levels of voriconazole in rodents: a model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug.* **J Pharm Biomed Anal**; 47:876–81, 2008.
7. ARAUJO, B.V.; SILVA, C.F.; HAAS, S.E.; DALLA COSTA, T. *Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis in healthy and Candida sp. infected Wistar rats.* **Inter. J. Antimicrob. Agents**, 33(2):154-9. 2009.
8. Araújo, Bibiana Verlindo. Modelagem PK/PD do antifúngico voriconazol. 2008 230p. Tese (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
9. Bidart H. T. *Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica* **Rev Chil Infect**; 21 (Supl 1): S13-S19. 2004.

10. BRUNNER, M.; DERENDORF, H. *Clinical microdialysis: current applications and potential use in drug development*. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 674-680, 2006.
11. Budha, N., Lee, R., Hurdle, J., Lee, R., Meibohm, B.. *A simple in vitro PK/PD model system to determine time–kill curves of drugs against Mycobacteria*. **Tuberculosis**, v. 89 p. 378–385, 2009.
12. BUSTAMANTE, C.I. *Treatment of Candida infection: a view from the trenches!* **Curr. Opin. Infect. Dis.** 18:490–495, 2005.
13. Charlier, C., Hart, E., Lefor, A., Ribaud, P., Dromer, F., Denning, D. and Lortholary, O. *Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years?* **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 57,p. 384–410, 2006
14. Chaurasia, C. Markus Müller, Edward D. Bashaw, Eva Benfeldt,, Jan Bolinder, Ross Bullock, Peter M. Bungay, Elizabeth C. M. DeLange, Hartmut Derendorf, William F. Elmquist, Margareta Hammarlund-Udenaes, Christian Joukhadar,, Dean L. Kellogg Jr, Craig E. Lunte, Carl Henrik Nordstrom, Hans Rollema, Ronald J. Sawchuk, Belinda W. Y. Cheung, Vinod P. Shah, Lars Stahle, Urban Ungerstedt, Devin F. Welty, and Helen Yeo, *AAPS-FDA Workshop White Paper: Microdialysis Principles, Application, and Regulatory Perspectives*. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, p.589-603, 2007
15. CLSI - *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras*; Norma Aprovada — Terceira Edição, Pennsylvania, Estados Unidos, 2007.
16. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Warnock D, Morgan J; *Brazilian Network Candidemia Study*. *Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers*. **J Clin Microbiol.**;44(8):2816-23, 2006.

17. Dalla Costa T, Nolting A, Rand K, Derendorf H. *Pharmacokinetic–pharmacodynamic modelling of the in vitro antiinfective effect of piperacillin–tazobactam combinations*. **Int J Clin Pharmacol Ther** v.35 p.426–33, 1997.
18. DE LA PENÑA, A.; GRABE, A.; RAND, K.H.; *et al.* *PK-PD modelling of the effect of cefaclor on four different bacterial strains*. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 23, n. 3, p. 218-225, 2004.
19. Debruyne, D. *Clinical pharmacokinetics of fluconazole in superficial and systemic mycoses*. **Clin Pharmacokinet** v. 33 p. 52–77, 1997.
20. DELACHER, S.; DERENDORF, F. H.; HOLLENSTEIN, V. *et al.* *A combined in vivo PK-in vitro PD approach to simulate target site pharmacodynamics of antibiotics in human*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 6, p. 733-739, 2000.
21. DERENDORF, H.; HOCHHAUS, G (Ed). *Pharmacokinetics Pharmacodynamics Correlation*. Boca raton: CRC Press, 1995.
22. DERENDORF, H.; MEIBOHN, B. *Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationship: concepts and perspectives*. **Pharm. Res.**, v. 6, n. 2, p. 176-185, 1999.
23. Diekema, D. J., S. A. Messer, A. B. Brueggemann, S. L. Coffman, G. V. Doern, L. A. Herwaldt, and M. A. Pfaller. *Epidemiology of candidemia: three-year results from the Emerging Infections and the Epidemiology of Iowa Organisms study*. **J. Clin. Microbiol.** v. 40 p.1298–1302, 2002.
24. Dodds, E.S.; Drew, R. H.; Perfect, J.R. *Antifungal Pharmacodynamics: Review of the Literature and Clinical Applications*. **Pharmacoth** v.20, n.11, p.1335-55, 2000.
25. Ebbert, S.C. *Application of pharmacokinetics and pharmacodynamics to antibiotic selection*. **P & T**. v.29 (4), p. 244 – 250, 2004.
26. Edwards J.E. Jr.. En: Mandell, Douglas, Bennett. *Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*. **Elsevier Churchill Livingston** p. 2938-57, 2005.

27. **FDA**, 2001. Guidance for Industry-bioanalytical method validation. Disponível em <http://fda.gov.br> Acessado em Setembro de 2012.
28. França, J.C.B., Ribeiro, E.L., Telles, F. *Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 41(1) p. 23-28, 2008.
29. FRIDKIN, S. K., JARVIS, W. R. *Epidemiology of nosocomial fungal infections*. **Clin Microbiol Rev**, v. 9:499—511, 1996.
30. Ghannoum, M. A., and Rice, L.B. *Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance*. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 12 p. 501–517, 1999.
31. Gomez, J., Garcia-Vazques, E., Hernandez, A., Espinosa, C., Ruiz, J. *Candidemias nosocomiales: nuevos retos de um problema emergente*. **Rev Esp Quimioter**. v. 23(4), p.158-168, 2010.
32. Horn., D.L., Neofytos, D., Anaissie, E. Fishman, A., Steinbach, W., Olyaei, A., Marr, K., Pfaller, M., Chang, C., Webster, K. *Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry*. **Clinical Infectious Diseases**. v. 48, p. 1695–703, 2009.
33. Hughes, C.E., Beggs, W.H. *Action of fluconazole (UK-49,858) in relation to other systemic antifungal azoles*. **J Antimicrob Chemother**, v. 19 p. 171–174, 1987.
34. HUMPHREY, M.J., JEVONS, S. and TARBIT, S.H.. *Pharmacokinetic Evaluation of UK-49,858, a Metabolically Stable Triazole Antifungal Drug, In Animals and Humans*. *Ant Agents and Chemotherapy*, v. 11, p. 648-653, 1985.
35. JOHANSEN, M. J.; NEWMAN, R. A.; MADDEN, T. The use of microdialysis in pharmacokinetic and pharmacodynamic. **Pharmacother.**, v. 17, n. 3, p. 464-481, 1997.

36. JOUKHADAR, C., DERENDORF, H., MULLER, M. *Microdialysis- a novel tool for clinical studies of anti-infective agents*. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** 57: 211-219, 2001.
37. Koks, C.H., Meenhorst, P.L., Hillebrand, M.J., Bult, A., Beijnen, J.H. *Pharmacokinetics of fluconazole in saliva and plasma after administration of an oral suspension and capsules*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 40 p. 1935-7, 1996.
38. LACAZ, C.S.; PORTO, A.; MARTINS, E.C.M. **Micologia médica: fungos actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1991.
39. Li, Y., Nguyenb, M., Cheng, S., Schmidt, S., Zhong, L., Derendorf, H. and Clancy, C. *A pharmacokinetic/pharmacodynamic mathematical model accurately describes the activity of voriconazole against Candida spp. in vitro*. **Int J Antimicrob Agents.** v.31(4) p. 369–374, 2008.
40. LIU, P. et al. *Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial activity of cefpodoxime and cefixime in in vitro kinetic models*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 120-129, 2005.
41. Louie A, Drusano GL, Banerjee P et al. *Pharmacodynamics of fluconazole in a murine model of systemic candidiasis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42 p. 1105–9, 1998.
42. Mager, D., Wiska, E., Jusko, W. J. *DIVERSITY OF MECHANISM-BASED PHARMACODYNAMIC MODELS*. **Drug Met and Disp.** v. 31, p. 510–519, 2003
43. Mauric, O., Thallingerb, C., Kugler, S., Kovar, F., Konz, H., Graninger, W., Joukhadar, C. *The Ability of Fluconazole to Penetrate into Ventilated, Healthy and Inflamed Lung Tissue in a Model of Severe Sepsis in Rats*. **Pharmacology**;v. 87 p. 130–134, 2011.
44. Meibohm B, Derendorf H. *Pharmacokinetic/pharmacodynamic studies in drug product development*. **J Pharm Sci**, v.91 p. 18–31, 2002.

45. Mohamed, A.F., Nielsen, E.I., Cars, O., Friberg, L.E. *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model for Gentamicin and Its Adaptive Resistance with Predictions of Dosing Schedules in Newborn Infants*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 56(1) p.179-190, 2012.
46. MOUTON, J. W.; VINKS, A. T. T.; PUNT, N. C. *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic modeling of activity of ceftazidime during continuous and intermittent infusion*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 4, p. 733-738, 1997.
47. Mouton, J.W., Dudley, M.N., Cars, O., Derendorf, H., Drusano, G.L. Standardization of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *J. Antimicrob. Chemother.* v.55 p. 601-607, 2005.
48. MULLER, M.; DE LA PENÑA, A.; DERENDORF, H. *Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-infective Agents: Distribution in Tissue*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 1441-1453, 2004.
49. Nolting A, Dalla Costa T, Rand KH, Derendorf H. *Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antibiotic effect of piperacillin in vitro*. **Pharm Res** v.13 p. 91-6, 1996.
50. Palma, Eduardo Celia. *Modelagem PK/PD do efeito bactericida do Norfloxacino contra diferentes microrganismos*. **Dissertação (mestrado)**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
51. PAPPAS, P.G., REX, J.H., SOBEL, J.D., FILLER, S.J., DISMUKES, W.E., WALSH, T.J., EDWARDS, J.E. *Guidelines for treatment of candidiasis*. **Clin. Infect. Dis.** 38:161-189, 2004.
52. Pereira, R., Fidelis, S., Vanunci, M.L. *Bioequivalence study of two fluconazole capsule Formulations in healthy volunteers*. **Int. Clin Pharmacol Ther.** v. 42 p. 39-42, 2004.

53. Pfaller MA, Diekema DJ. *Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem*. **Clin Microbiol Rev**, v. 20 p. 133-63, 2007.
54. Pfaller, M. A., and D. J. Diekema. *Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of Candida*. **Clin. Microbiol. Infect**, v. 10(Suppl. 1) p.11–23, 2004.
55. Pfaller, M. A., D. J. Diekema, and D. J. Sheehan. *Interpretive breakpoints for fluconazole and Candida revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing*. **Clin. Microbiol. Rev.** v.19 p. 435–447, 2006.
56. Pfaller, M. A., S. A. Messer, L. Boyken, C. Rice, S. Tendolkar, R. J. Hollis, and D. J. Diekema. *Cross-resistance between fluconazole and ravuconazole and the use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to ravuconazole among 12,796 clinical isolates of Candida spp.* **J. Clin. Microbiol**, v. 42 p. 3137–3141, 2004.
57. Plock, N., Kloft, C. *Microdialysis—theoretical background and recent implementation in applied life-sciences*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25 p. 1–24, 2005.
58. Richardson, K., Cooper, K., Marriott, M.S., Tarbit, M.H., Troke, F., Whittle, P.J. *Discovery of Fluconazole, a Novel Antifungal Agent*. **Clin Infect Dis.** v. 12 (Supplement 3) p. S267-S271, 1990.
59. Samra Z, Yardeni M, Peled N, Bishara J. *Species distribution and antifungal susceptibility of Candida bloodstream isolates in a tertiary medical center in Israel*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** v. 24 p. 592-5, 2005.
60. SANATI, H.; BELANGER, P.; FRATTI, R. A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida kruzei*. **Antimicrob Agents Chemother.** 41: 2492-2496, 1997.

61. SCHMIDT, S.; BARBOUR, A.; SAHRE, M.; RAND, K.H.; DERENDORF, H. *PK/PD: new insights for antibacterial and antiviral applications*. **Cur. Opinion Pharmacol.** 8 (5): 549-556, 2008.
62. SHEEHAN, D.J., HITCHCOCK C.A, SIBLEY C.M. *Current and emerging azole antifungal agents*. **Clin Microbiol Rev** 12: 40–79, 1999.
63. Schuck, E.L., Derendorf, H. *Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of anti-infective agents*. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v.3 p.:361–73, 2005.
64. Tasso, L., de Andrade, C., Dalla Costa, T. *Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of the bactericidal activity of free lung concentrations of levofloxacin and gatifloxacin against Streptococcus pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents.** v. 38, p. 307– 313, 2011.
65. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) – Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). *Points to consider on pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antibacterial medicinal products*. London, UK; 2000.
66. The U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. *Developing antimicrobial drugs-general considerations for clinical trials*. Rockville, MD; 1998.
67. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S, Grillot R. *Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, 23(4):317-22, 2004.
68. VENISSE, N.; GREGOIRE, N.; MARLIAT, M.; COUET, W. *Mechanism-Based Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Models of In Vitro Fungistatic and Fungicidal Effects against Candida albicans*. **Antim. Agents Chemother.** v.52 (3) p. 937-943, 2008.

69. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. *Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study.* **Clin Infect Dis.**, 39(3):309-17, 2004.
70. Xavier, F., Benoit, M., Denis, V., Ann, W., Roger, D.W., Verbeeck, K., Preat, V.. *On-line determination of fluconazole in blood and dermal rat microdialysates by microbore high-performance liquid chromatography.* **Journal of Chromatography B**, v. 787 p. 323–331, 2003.
71. Yang H, Wang Q, Elmquist WF. *Fluconazole distribution to the brain: a crossover study in freely-moving rats using in vivo microdialysis.* **Pharm Res.** v.13, p.1570–5, 1996.

ANEXO. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2008187

Título : Modelagem Farmacocinética/Farmacodinâmica do Antifúngico Flucozanol

Pesquisador (es)

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA	PESQ. RESPONSÁVEL	dalla.costa@ufrgs.br	33085218
FRANCINE JOHANSSON AZEREDO	PESQUISADOR		

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS em reunião nº 60, ata 140, de 19/11/2009, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, segunda-feira, 1º de março de 2010


JOSE ARTUR BOGO CHIES
Coordenador do CEP-UFRGS