UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Monitoramento de antifúngicos em plasma e líquido de pacientes portadores
de meningite criptocócica e AIDS através de Cromatografia Líquida de Alta
Eficiência – UV/Vis

Grazziela Samantha Perez

Tese para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profda. Dra. Sílvia R.C.J. Santos

São Paulo
2007

Grazziela Samantha Perez

Monitoramento de antifúngicos em plasma e líquido de pacientes portadores de meningite criptocócica e AIDS através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – UV/Vis

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Sílvia R. C. J. Santos
orientadora/presidente

Profa. Dra. Sílvia Storpirtis

Prof. Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento

São Paulo, 17 de dezembro de 2007.

DEDICATÓRIA

A Deus por sua Graça e Misericórdia e por todas as bênçãos a mim concedidas.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e me deram suporte.

AGRADECIMENTOS

À Professora Silvia Regina Cavani Jorge Santos pelos ensinamentos, orientações, conselhos e dedicação incansáveis.

Aos amigos do Laboratório, Adriana, Carlos, Cris, Dani, Edgar, Karin, Mauro, Verônica pela ajuda e companhia.

À Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas por possibilitar a realização deste projeto.

A todos os professores, Carlota, Adalberto, Zanini, Célia que ministraram disciplinas essenciais à minha formação.

A todos os colegas da Pós-Graduação que me ajudaram com dicas valiosas e aos amigos em geral pela “força”.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

RESUMO

Desenvolveram-se métodos bioanalíticos para determinação de anfotericina B e fluconazol em apenas 200 µL de plasma e líquido (LCR) através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE UV-VIS). A anfotericina B foi determinada através de CLAE-VIS utilizando p-nitrofenol como padrão interno, após purificação das matrizes biológicas com acetonitrila, seguida da análise em coluna Nova Pak C18 (150 x 3,9mm, 4 micron) e fase móvel constituída por tampão acetato 0,1M pH 5,0 e acetonitrila (50:50,v/v) 0,5mL/min em 385nm; o tempo de corrida foi 15 min. Através da validação o método mostrou-se robusto com 0,2-25,0 µg/mL (linearidade, r^2 0,9999), LD 0,1µg/mL, precisão (5,4% e 6,9%), exatidão expressa através do erro sistemático (3,3% e 2,2%): intra e interdias). Os estudos de estabilidade evidenciaram 1,0% para o erro sistemático e 3% de precisão na bandeja (tempo e condição de análise por 24 h), e os ciclos de congelamento evidenciaram boa estabilidade uma vez que todos os ensaios foram realizados em Laboratório de luz amarela. O fluconazol foi determinado através de CLAE-UV utilizando carbamazepina como padrão interno, após purificação das matrizes biológicas pela extração líquido-líquido com diclorometano em meio alcalino, seguido da análise em coluna Nova Pak C18 (150 x 3,9mm, 4 micron) e fase móvel constituída por água UP e acetonitrila (70:30,v/v) 0,5mL/min em 210nm; o tempo de corrida foi 15 min. O método mostrou-se robusto com 0,2-250 µg/mL (linearidade, r^2 0,9998), LD 0,1µg/mL, com boa recuperação absoluta (98%) e relativa (100%), precisão 0,5%/1,3%, exatidão expressa através do erro sistemático (1,2%). Evidenciou-se ótima estabilidade para os extratos em bandeja (tempo e condição de análise por 24 h), na longa duração (-20° C, 9 meses) e através dos ciclos de congelamento. Investigaram-se 21 pacientes adultos de ambos os sexos portadores de meningite criptocócica com AIDS após internação emergencial em

terapia de alta dose com anfotericina B (1mg/Kg) e fluconazol (400 mg, 12/12 horas) durante 12 semanas. O monitoramento das concentrações de anfotericina B e fluconazol no plasma e no LCR forneceram as razões que permitiram estimar a penetração dos antifúngicos no SNC. Obtiveram-se concentrações de anfotericina B, médias (IC95%): 2,30 (0,02-5,08) µg/mL no plasma e 0,30 (0,19-0,36) µg/mL no LCR. As concentrações do fluconazol, médias (IC95%) foram: 31,7 (20,1-43,3) µg/mL no plasma e 19,4 (11,1-27,7) µg/mL no LCR. Com base nos resultados obtidos conclui-se que a penetração da anfotericina B foi insuficiente (10-27%), enquanto que a do fluconazol mostrou-se adequada com valores médios (IC95%) de 67 (47-87) %.

Palavras chave: Anfotericina B, fluconazol, CLAE, plasma, LCR, penetração SNC

ABSTRACT

Analytical methods were developed to determine amphotericin B and fluconazole in only 200 μ L of plasma and in cerebrospinal fluid (CSF) by liquid chromatography (HPLC UV-VIS). Amphotericin B was determined by HPLC - VIS using p-nitrophenol as internal standard, after the purification of biological matrices using acetonitrile, followed by chromatographic analysis in a Nova Pak C18 column (150 x 3.9mm, 4 micron) and mobile phase consisting of acetate buffer 0.1M pH 5.0 plus acetonitrile (50:50,v/v) 0.5mL/min at 385nm; the run time required was 15 min. Bioanalytical method validated showed robustness, 0.2-25,0 μ g/mL (linearity, r^2 0.9999), DL 0.1 μ g/mL, precision (5.4%/6.0%), accuracy expressed as systematic error (3.3%/2.2%). The stability was investigated, error systematic was 1% for the vials on the rack (time and conditions of drug analysis, 24h). Thawing cycles showed good stability after three freezing-thawing cycles. All procedures were performed under yellow light at room temperature. Fluconazole was determined by HPLC - UV using carbamazepine as internal standard, after the purification of biological matrices using liquid-liquid extraction in alkaline medium, followed by chromatographic analysis in a Nova Pak C18 column (150 x 3.9mm, 4 micron) and mobile phase consisting of purified water plus acetonitrile (70:30,v/v) 0.5mL/min at 210nm; the run time required was 15 min. Bioanalytical method validated showed robustness, 0.2-250 μ g/mL (linearity, r^2 0.9998), DL 0.1 μ g/mL. Absolute recovery was 98% and relative recovery was 100%, intra/interday precision were 0,5/-1,3%; accuracy expressed as systematic error were 1.2%/1.2%.and relative recovery was 100%. Good stability for the vials on the rack (time and conditions of drug analysis, 24h) and long term stability (at -20° C for 9 months) were demonstrated. Also thawing cycles showed good stability after three freezing-thawing

cycles. Twenty one adult patients of both sex were investigated. Inpatients with meningitis by *Cryptococcus neoformans* with AIDS were under high dose therapy with amphotericin B 1mg/Kg plus fluconazole 400 mg, every 12h during 12 weeks. Therapeutic monitoring of amphotericin B and fluconazole in plasma and in CSF showed ratios that indicate the penetration of antifungal drugs into CNS. Mean (CI95%) data were for amphotericin B 2.30 (0.02-5.08) $\mu\text{g/mL}$ in plasma and 0.30 (0.19-0.36) $\mu\text{g/mL}$ in CSF. Fluconazole showed 31.7 (20.1-43.3) $\mu\text{g/mL}$ in plasma and 19.4 (11.1-27.7) $\mu\text{g/mL}$ in CSF. Based on data obtained we conclude that the penetration of amphotericin B was poor (10-27%) while fluconazole was adequate 67% (47-87%), mean (CI95%).

Key words: Amphotericin B, fluconazole, HLPC, plasma, CSF, penetration to CNS

Lista de abreviaturas e siglas

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AUC	Área sobre a curva
CIM	Concentração mínima inibitória
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência – ultra-violeta
CLAE-Vis	Cromatografia líquida de alta eficiência – visível
CQ	Controle de qualidade
CV%	Coeficiente de variação
EDTA	Etilenodiaminotetracético sal sódico
EPM	Erro padrão da média
ES	Erro sistemático
Fel	Fração eliminada
HAART	Terapia antiretroviral potente
g	Grama
IC95%	Intervalo de confiança 95%
Kg	Quilograma
L	Litro
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m	Metro
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N ₂	Nitrogênio
µg	Micrograma
PI	Padrão Interno
r ²	Coeficiente de correlação linear
SNC	Sistema nervoso central
v/v	Volume por volume

Lista de Fluxogramas

	Página
Fluxograma 1. Determinação de anfotericina B em plasma e LCR.	23
Fluxograma 2. Determinação de fluconazol em plasma e LCR.	27

Lista de Figuras

Página

- Figura 1.** Perfil cromatográfico CLAE-Vis, 385nm. Cromatogramas: plasma branco (A) e calibrador (B), picos: 1) *p*-nitrofenol (padrão interno) em 3,4min e 2) anfotericina B em 5,3 min. 37
- Figura 2.** Linearidade e curva de calibração diária para a anfotericina B em plasma (0,2 – 25,0 µg/mL) utilizando a *p*-nitrofenol como padrão interno. 38
- Figura 3.** Perfil cromatográfico pela análise do fluconazol. Cromatogramas: plasma branco (A), calibrador (B). Picos: (1) fluconazol em 3,6 minutos e (2) carbamazepina (padrão interno) em 10,7minutos. 40
- Figura 4.** Linearidade e curva de calibração diária (0,2-250µg/mL) para fluconazol em plasma, utilizando a carbamazepina como padrão interno. 41

Lista de Tabelas

Página

Tabela 1. Limites de confiança do método de determinação de anfotericina B em plasma.	39
Tabela 2. Estudos de estabilidade da anfotericina B em plasma.	39
Tabela 3. Limites de confiança do método de determinação de fluconazol em plasma.	42
Tabela 4. Estabilidade do fluconazol em plasma.	43
Tabela 5. Concentração da anfotericina B no plasma e LCR de pacientes portadores de meningite criptocócica, n=21, 1mg/Kg uma vez ao dia, infusão intravenosa de 4 horas.	44
Tabela 6. Concentração de fluconazol no plasma e LCR de pacientes portadores de meningite criptocócica, n=21, recebendo infusão de 400mg duas vezes ao dia.	45

Sumário

1 - INTRODUÇÃO	2
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Meningite Criptocócica em pacientes com AIDS	3
2.2 Terapia Farmacológica	7
2.2.1 Anfotericina B.....	8
2.2.2 Fluconazol	10
3 - OBJETIVOS.....	13
3.1 Principal.....	13
3.2 Secundários	13
4 - MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Validação de Método analítico	14
4.1.1 Especificidade	14
4.1.2 Limite de detecção e quantificação	15
4.1.3 Linearidade	16
4.1.4 Curva de Calibração	16
4.1.5 Recuperação	17
4.1.6 Exatidão	17
4.1.7 Precisão	18
4.1.8 Estabilidade	18
4.1.9 Robustez	20
4.2 Desenvolvimento de método analítico para quantificação de anfotericina B em plasma e líquido.....	20
4.2.1 Reagentes, soluções e padrões de referência	20
4.2.2 Procedimento de Purificação	21
4.2.3 Análise Cromatográfica	24
4.3 Desenvolvimento de método analítico para quantificação de fluconazol em plasma e líquido.....	24
4.3.1 Reagentes, soluções e padrões de referência	24
4.3.2 Procedimento de Extração	25
4.3.3 Análise Cromatográfica	28
4.4 Protocolo Clínico	28
4.4.1 Casuística.....	28
4.4.2 Critérios de inclusão no Estudo.....	29
4.4.3 Critérios de exclusão no Estudo	29
4.4.4 Considerações Éticas	30
4.4.5 Medicação e administração de anfotericina B	31
4.4.6 Medicação e administração de anfotericina B	31
4.4.7 Monitoramento Terapêutico dos antifúngicos nos pacientes com Meningite Criptocócica.....	33
4.4.7.1 Justificativa de punção lombar.....	34
4.4.7.2 Análise de riscos e benefícios	34

4.4.7.3 Critérios para suspender ou encerrar a pesquisa	36
4.4.7.4 Medidas de proteção de risco e confidencialidade	37
5 - RESULTADOS.....	37
5.1 Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de anfotericina B em plasma e líquido	37
5.2 Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de fluconazol em plasma e líquido.....	41
5.3 Monitoramento terapêutico	44
5.3.1 Anfotericina B no plasma e líquido dos pacientes e penetração no SNC	44
5.3.2 Fluconazol no plasma e líquido dos pacientes e penetração no SNC.....	45
6 - DISCUSSÃO	46
6.1 Validação do método analítico para determinação de anfotericina B	46
6.2 Validação do método analítico para determinação de fluconazol	48
6.3 Monitoramento terapêutico	51
6.3.1 Penetração de anfotericina B no SNC nos pacientes com meningite criptocócica	51
6.3.2 Penetração de fluconazol no SNC nos pacientes com meningite criptocócica	52
7. CONCLUSÕES	55
8 - REFERÊNCIAS.....	57
<u>Apêndices</u>	
<u>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</u>	
<u>Anexos</u>	

1 – INTRODUÇÃO

A meningite criptocócica é uma micose muito severa cuja incidência vem aumentando principalmente em função de doenças imunossupressoras, destacando-se a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Essa infecção oportunista é geralmente fatal levando a óbito. Essa doença ocupa o segundo lugar dentre as infecções oportunistas relacionadas à AIDS, perdendo apenas para a tuberculose (ALAK *et al.*, 1996; BROUWER *et al.*, 2004; CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006; SAAG *et al.*, 2000).

A incidência de tratamentos mal sucedidos nesses pacientes é da ordem de 50-60% (DISMUKES, 1988). A recidiva da meningite criptocócica pode ocorrer em 25% podendo chegar até 60% dos casos, a menos que a profilaxia com fluconazol, 200 mg ao dia seja empregada ambulatorialmente pelo resto da vida (ALAK *et al.*, 1996).

O manejo dessa doença é dramaticamente limitado pelo alto índice de mortalidade e número de recidivas; além disso, deve-se considerar a segurança dos antifúngicos de primeira escolha como a anfotericina B e o fluconazol, uma vez que o tratamento exige terapia de alta dose (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006).

A anfotericina B é um antifúngico largamente utilizado nas micoses sistêmicas, apresentando alta atividade, amplo espectro de ação, atividade fungicida e rara indução de resistência. Entretanto, muitos de seus efeitos adversos limitam o sucesso da terapia (BAGINSKI *et al.*, 2005; CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006; RISOVIC *et al.*, 2003).

O fluconazol é um antifúngico da classe dos triazóis, descoberto mais recentemente e melhor tolerado que o anterior, embora mostre alguns efeitos adversos, quando utilizado por período prolongado (HENDERSON & CHAPMAN, 2003).

O monitoramento terapêutico desses antifúngicos é custo efetivo e garante a maximização da eficácia e a minimização dos efeitos adversos. Inúmeros métodos foram reportados para determinação de anfotericina B e fluconazol em matrizes biológicas

através da cromatografia líquida de alta eficiência; entretanto, a maioria apresentou baixa seletividade, além de problemas relacionados a reprodutibilidade, linearidade e estabilidade dos fármacos (ALAK *et al.*, 1996; COCIGLIO *et al.*, 1996; EGGER *et al.*, 2001; EGLE *et al.*, 2004; ELDEM & ARICAN-CELLAT, 2001; INAGAKI *et al.*, 1992; KIM & LIM, 1984; KOKS *et al.*, 1994; LAMBROS *et al.*, 1996; LOPEZ *et al.*, 1998; LOPEZ-GALERA *et al.*, 1995; NG *et al.*, 1996; WALLACE *et al.*, 1992; WATTANANAT & WIYADA, 2006).

Sendo assim, objetivo do presente estudo foi desenvolver método bioanalítico robusto em cromatografia líquida de alta eficiência para o fluconazol e para a anfotericina B em matrizes biológicas que reunisse os requisitos de boa especificidade e seletividade, alta sensibilidade e larga linearidade, garantindo-se ainda precisão e exatidão aceitáveis além de baixo custo relativo. Adicionalmente, a realização do estudo da penetração desses antifúngicos no sistema nervoso central (SNC), sítio de ação desses fármacos nos pacientes com meningite criptocócica e AIDS, é proposta pela determinação das concentrações líquóricas daqueles fármacos.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Meningite Criptocócica em paciente com AIDS

A meningite criptocócica é uma micose severa que acomete o SNC e está relacionada hoje à epidemia de AIDS (LARSEN *et al.*, 2004). O *Cryptococcus neoformans* causador da doença; é um fungo saprófita com capacidade bioquímica complexa que resiste a extensa variedade de condições inóspitas (HARRISON, 2000). A patogenia desse fungo foi reconhecida em 1894 (BARRETO DE OLIVEIRA *et al.*, 2004;

INWIDTHAYA & PONGVARIN, 2000; LIZARAZO *et al.*, 2007; MITCHELL & PERFECT, 1995). Fernandes *et al.* (2000) não conseguiram estabelecer correlação entre a ocorrência do *Cryptococcus neoformans* e o *habitat*; no entanto, outros autores reportaram associação entre o *Cryptococcus neoformans var. gatti* e árvores de eucaliptos, e ainda entre o *Cryptococcus neoformans var. neoformans* e excrementos de aves.

A variedade *C. neoformans* serotipo A é a causadora predominante da meningite criptocócica associada à doença de AIDS no Brasil (FERNANDES *et al.*, 2000; PAPPALARDO & MELHEM, 2003). Alguns autores classificam esta variedade *C. neoformans var. neoformans* serotipo A numa nova variedade, *C. neoformans var. grubii* (BARRETO DE OLIVEIRA *et al.*, 2004; LIZARAZO *et al.*, 2007); os demais autores classificam as duas anteriores em quatro serotipos A, B, C e D, além do híbrido AD. Os serotipos A, D e AD estão relacionados a *var. neoformans*, enquanto que os serotipos B e C estão relacionados a *var. gatti* (FERNANDES *et al.*, 2000; HARRISON, 2000; INWIDTHAYA *et al.*, 2000; MITCHELL & PERFECT, 1995; PAPPALARDO & MELHEM, 2003).

A doença se inicia através da via respiratória após a inalação de esporos do *Cryptococcus neoformans*, que penetram nos alvéolos ocorrendo, a migração de macrófagos. Apesar do mecanismo modulador da resposta imune não estar totalmente elucidado, sabe-se que a infecção ocorre primeiramente nos pulmões, e se estende para a pele, ossos, próstata, com predileção para o SNC. A infecção uma vez instalada no SNC evolui para a meningite criptocócica, caracterizada pela diminuição das células CD4 que decaem até 100 células/mm³ (LIZARAZO *et al.*, 2007; WILKS, 2005).

Em 90% dos pacientes com AIDS, os sintomas predominantes da meningite são a febre e a cefaléia. Outros sintomas menos específicos são a náusea, vômito e mal-estar (50%), fotofobia (30%), alteração do estado mental (20%) e convulsões em cerca de

10% dos doentes (DISMUKES, 1988; FERNANDES *et al.*, 2000; MITCHELL & PERFECT, 1995).

As complicações de maior incidência são a hidrocefalia, os distúrbios visuais incluindo a cegueira, a perda de audição, acometimento de nervos cranianos, ataxia, convulsões, demência e hipertensão intracraniana. Pappalardo & Melhem (2003), em estudo de revisão reporta que o aumento da letalidade nos pacientes com AIDS é consequência da hipertensão intracraniana subdiagnosticada e ausência de controle adequado (PAPPALARDO & MELHEM, 2003; PEREZ-RAMIREZ *et al.*, 1991). Assim, é fundamental que todas as punções líquóricas sejam realizadas com raquimanometria para que as medidas terapêuticas eficazes possam ser prontamente tomadas.

Os pacientes com AIDS mostram alta taxa de morbidade e mortalidade por essa infecção fúngica (LIZARAZO *et al.*, 2007; PAPPALARDO & MELHEM, 2003). Sua incidência nos EUA, Europa e Austrália ocorre entre 6% e 10% dos pacientes com AIDS. Na África, em decorrência das complicações apresentadas antes do 15º dia da terapia, este percentual de mortalidade aumenta para 35% podendo chegar até 60% nos primeiros 12 meses. (MITCHELL & PERFECT, 1995; POWDERLY, 1993). Na Tailândia, apesar do tratamento convencional dos pacientes, reportou-se taxa mortalidade de 43%, com sobrevivência média de 14 dias; Brouwer *et al.* (2004), justificou essa taxa pela elevação da pressão intracraniana em função do tratamento pouco efetivo, uma vez que são requeridas mais de 2 semanas de terapia para esterilização do líquido cefalorraquidiano (LCR). Reportou-se ainda nos pacientes com meningite criptocócica e AIDS 50% de positividade do fungo nas hemoculturas (CHUCK & SANDE, 1989; DISMUKES, 1988; KOVACS *et al.*, 1985; LA ROCCO, 1992; LIZARAZO *et al.*, 2007; ZUGER *et al.*, 1986).

Os fatores e sinais de mau prognóstico são baseados no estado mental do paciente no momento do diagnóstico, idade inferior a 35 anos, título do antígeno criptocócico no LCR superior a 1024, cultura positiva para *Cryptococcus neoformans*,

diminuição do número de células inflamatórias no LCR, além de hiponatremia e criptococose extraneural (CHUCK & SANDE, 1989; DISMUKES, 1988; KOVACS *et al.*, 1985; LARSEN *et al.*, 1989; SAAG *et al.*, 1992; ZUGER *et al.*, 1986). O pior prognóstico da doença está relacionado ao número de leucócitos inferior a 20 células/mm³ no LCR, uma vez que essas células indicam a resposta inflamatória efetiva do hospedeiro (CHUCK & SANDE, 1989; DISMUKES, 1988 ; KOVACS *et al.*, 1985; LARSEN *et al.*, 1989; SAAG *et al.*, 1992; VANDEPITTE , 1990; ZUGER *et al.*, 1986).

O uso da terapêutica antiretroviral (HAART) a partir de 1996, evidenciou o aparecimento da reconstituição imunológica, uma nova síndrome descrita para os pacientes com AIDS, uma vez que o sistema imunológico se fortalece, ocorrendo resposta inflamatória exuberante, o que dificulta o diagnóstico das infecções oportunistas. No caso específico de meningite criptocócica, pode aparecer nos pacientes imunocompetentes no exame quimiocitológico do LCR: baixa celularidade, predomínio linfomonocitário, elevação das proteínas, glicose normal ou pouco alterada, além da diminuição das células fúngicas. Adicionalmente, a cultura de LCR pode ser negativa, e ocorrer a linfadenite criptocócica, como único sinal da infecção fúngica (HADDAD & POWDERLY, 2001; MANFREDI *et al.*, 2003).

Uma série de fatores está relacionado a doença de base e justificam a falência terapêutica. Neste contexto, é importante que o paciente seja aderente ao tratamento com os antiretrovirais, uma vez que o aumento das células CD4 está relacionado diretamente ao controle das infecções oportunistas (CROWE *et al.*, 1991). Outros fatores estão relacionados às complicações da própria meningite criptocócica, ou mesmo ao agente etiológico, quanto à virulência e resistência “*in vitro*” da cepa aos antifúngicos.

A patogênese de *C. neoformans* pode ser determinada pela virulência da cepa infectante (KWON-CHUNG, 1992). As cepas de *C. neoformans* são capazes de crescer “*in vitro*” a 37°C, produzir as enzimas fenoloxidase, proteinase e fosfolipase. A melanina,

produto final da ação da fenoloxidase, pode atuar como antioxidante, protegendo *C. neoformans* das defesas oxidativas, tais como hipoclorito das células inflamatórias do hospedeiro (JACOBSON & TINNELL, 1993). Por outro lado, as amostras mutantes não produtoras de melanina possuem menor virulência (RHODES *et al.*, 1982). A proteinase e a fosfolipase são importantes na invasão do tecido do hospedeiro, podendo estar relacionada a imunoglobulina G e ao fator 5 do sistema complemento (CASADEVALL & PERFECT, 1998; CHEN *et al.*, 1996; VIDOTTO *et al.*, 1998; VIDOTTO *et al.*, 2000).

A ocorrência de amostras resistentes aos antifúngicos utilizados no controle da doença pode explicar a recorrência da infecção. Através da concentração inibitória mínima (CIM) pode-se determinar o perfil de sensibilidade da cepa ao antifúngico. A resistência aos antifúngicos está relacionada a maior ou menor quantidade de ergosterol e de 14 α -desmetilase na parede celular (LEDINGHAM & WARRELL, 2000; PFALLER *et al.*, 2005).

2.2 Terapia Farmacológica

A grande dificuldade de controle da meningite criptocócica pelos antifúngicos, é que tal como nas células de mamíferos, os fungos são eucariontes, o que faz com que os agentes que inibem a síntese de proteínas, RNA e DNA tenham alto potencial para a toxicidade no hospedeiro.

As principais classes de agentes antifúngicos sistêmicos são os poliênicos; derivados de azóis, tiocarbamatos; e os fluoropirimidinas, que agem no ergosterol da membrana fúngica (GEORGOPAPADAKOU *et al.*, 1996; GROLL, 2002). O arsenal terapêutico disponível atualmente para o tratamento da doença é a anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol (SAAG *et al.*, 2000; PFALLER *et al.*, 2005). O

tratamento de escolha para meningite criptocócica associada a AIDS envolve a fase aguda ou de indução com anfotericina B, com duração de 6 até 10 semanas, e a fase de manutenção com fluconazol por longo período, até resultado negativo da cultura no LCR através dos testes microbiológicos. Considera-se como critério para mudança da indução para a manutenção, um período de duas a quatro culturas consecutivas com resultados negativos para as culturas (KHANNA et al.,1996; POWDERLY et al.,1992 ; SAAG et al., 1992). Bailly et al.(1991) sugerem ainda como parâmetro para mudança de fase de tratamento a urocultura negativa após massagem prostática.

2.2.1 Anfotericina B

A anfotericina B é produzida pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*, descoberta em 1955 e pertence a classe dos antibióticos macrolídeos poliênicos. Sua molécula, ilustrada a seguir, é formada pela porção hidrófila contendo vários carbonos hidroxilados e uma porção hidrófoba constituída por sete carbonos unidos pôr ligações duplas e uma cadeia lateral de micosamina, é fungistático e fungicida dependendo da sensibilidade do fungo e da concentração alcançada no local da infecção. Seu efeito antifúngico está baseado na ligação da molécula de esteróis de células eucariotas, sua afinidade é maior pelo ergosterol na membrana da célula fúngica do que pelo colesterol das células de mamíferos, causando defeitos na estrutura da membrana, aumento da permeabilidade e perda de elementos essenciais (CATALÁN & MONTEJO, 2006; WALSH & PIZZO, 1988). Na clínica, evidenciou atividade contra *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida glabrata*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides braziliensi*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium marneffeii*, e outros agentes de mucomicoses; com exceção, algumas espécies de *Candida*

lusitaniae, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica* ou *C. tropicalis*, *Pseudallescheria boydii* e algumas cepas de *Fusarium* e *Trichosporon* apresentam resistência a anfotericina B (CATALÁN & MONTEJO, 2006).

Estrutura química da Anfotericina B, $C_{47}H_{73}NO_{17}$, PM: 924,1.

Relativamente a farmacocinética, sua baixa biodisponibilidade oral é devido a pobre absorção deste agente no trato gastrointestinal. A administração através de infusão intravenosa de 0,5 mg/kg em adultos, resulta em concentrações plasmáticas ao redor de 1,0 a 1,5 µg/ml, decaindo para 0,5 a 1,0 µg/ml após 24 horas. Cerca de 90% do fármaco se apresenta ligado às proteínas plasmáticas e apenas 2-5% são encontrados na urina do paciente tratado. A penetração é baixa no LCR ou no líquido amniótico devido a sua extensa ligação às proteínas plasmáticas. Entretanto, é um fármaco de acúmulo uma vez que a eliminação é bifásica com o aparecimento de fase terminal lenta da ordem de 15 dias; tal fato pode ser justificado pela extensa ligação da anfotericina B às proteínas dos tecidos (DRUTZ, 1992).

As reações adversas mais comuns da anfotericina B são febre e calafrios seguidas por hiperpnéia, respiração diminuída e hipotensão; o bronco espasmo e a anafilaxia são raros. É necessário cautela nos pacientes com histórico de doenças

cardíacas ou pulmonares. A ocorrência de azotemia é alta (80%) nos pacientes que recebem anfotericina B para o tratamento da infecção fúngica sistêmica. A toxicidade é dose-dependente, reversível e aumentada pela terapia concomitante com outros agentes nefrotóxicos tais como os aminoglicosídeos e a ciclosporina A. A acidose renal pode ser observada durante o tratamento e mesmo após algumas semanas com depleção de potássio; nestes casos a suplementação é realizada em cerca de 70% dos pacientes em tratamento prolongado. Os efeitos adversos mais comuns são a anemia normocítica, cefaléia, náusea, vômito, mal estar, perda de peso e flebite; a encefalopatia pode ser atribuída ao tratamento com a anfotericina B mas os casos de trombocitopenia e leucopenia são raros (DRUTZ,1992).

As principais interações medicamentosas da anfotericina B ocorrem pelo uso concomitante de aminoglicosídeo, metoxiflurano e vancomicina levando ao aumento da nefro toxicidade, do efeito dos relaxantes musculares. Ressalta-se que a anfotericina B é antagonista do miconazol. Registrou-se pela associação aos corticosteróides, diuréticos e digitálicos, uma acentuada depleção de potássio. Adicionalmente, registrou-se pela associação a anfotericina B uma redução da depuração sistêmica da ciclosporina A. (OGA , BASILE & CARVALHO, 2002).

Fluconazol

O fluconazol, 2-(2,4-difluorophenyl)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-2-propanol, ilustrado abaixo é um antifúngico da classe dos triazóis, lançado no mercado em 1990, que atua através da inibição da enzima 14- α -desmetilase do sistema microssomal do CYP. Os triazóis, também, atuam impedindo a biossíntese de ergosterol, o que acarreta no acúmulo de 14- α -metilesteróis, responsável pela ação fungistática. As principais

indicações do fluconazol são no tratamento de candidíase e da meningite criptocócica em pacientes com AIDS pelas características farmacocinéticas (POWDERLY *et al.*, 1992).

Estrutura química do fluconazol, $C_{13}H_{12}F_2N_6O$, PM: 306,3

A absorção pelo trato gastrointestinal é excelente, sua biodisponibilidade oral excede 90%, portanto se obtêm níveis plasmáticos similares tanto após administração oral quanto após administração intravenosa. A presença de ácido no estômago não interfere na absorção; devido a esse fato, sua absorção permanece inalterada pelo uso concomitante de antiácidos (HENDERSON & CHAPMAN, 2003). Os esquemas de dose múltipla utilizando 50, 100, 200 e 400 mg, duas vezes ao dia evidenciaram farmacocinética linear (LEDINGHAM & WARRELL, 2000). A meia-vida de eliminação é de 25 a 30 horas e a ligação a proteínas plasmáticas é de 11-12% (COUSIN, 2003; DRUTZ, 1992; GALLAGHER & LEE, 2004). Cerca de 75% do fármaco é excretado sob forma inalterada na urina. Distribui-se rapidamente para os fluidos corporais; inclusive saliva, pele, humor aquoso e humor vítreo. As concentrações no LCR equivalem a 70% daquelas obtidas no plasma. A farmacocinética é semelhante em voluntários sadios adultos jovens e em idosos (HENDERSON & CHAPMAN, 2003). O volume aparente de distribuição é de 0,81 L/kg (COUSIN *et al.*, 2003).

Relativamente as interações farmacocinéticas, apesar da baixa metabolização o fluconazol pode aumentar os níveis plasmáticos de zidovudina, rifabutina, fenitoína,

varfarina e sulfoniluréis além da ciclosporina A, enquanto que a rifampicina pode reduzir em 25% sua biodisponibilidade (DRUTZ, 1992).

De modo geral, o fluconazol é bem tolerado, entretanto quando empregado por mais de uma semana seus principais efeitos adversos são náusea, dor de cabeça, *rash* cutâneo, vômitos, dor abdominal e diarreia. Relataram-se casos raros de óbito por insuficiência hepática ou pela síndrome de Stevens-Johnson. Registrou-se elevação transitória da função hepática que é relativamente comum em pacientes com AIDS (HENDERSON & CHAPMAN, 2003).

No tratamento da meningite criptocócica, utiliza-se o fluconazol, 200 -800mg ao dia, após estabelecido o controle inicial com a anfotericina B. No caso de pacientes aderentes, que possuam sinais de bom prognóstico, recomenda-se a monoterapia com 400 mg de fluconazol diários (HENDERSON & CHAPMAN, 2003). Na supressão da recidiva nos pacientes com AIDS, a dose recomendada é de 200 mg uma vez ao dia. Sugere-se que a dosagem diária seja reduzida em pacientes portadores de insuficiência renal; na reposição, recomenda-se administrar a dose usual após cada sessão para os pacientes submetidos regularmente a hemodiálise (COUSIN *et al.*, 2003; HENDERSON & CHAPMAN, 2003).

Em vista da complexidade da doença nos pacientes com AIDS, a literatura se mostra escassa quanto ao estudo dos fatores de mau prognóstico relacionados ao hospedeiro e ao agente. Além disso, a história natural da doença modificou-se pela co-infecção com o vírus HIV e, mais ainda, pelo uso de terapia antiretroviral potente (HAART). Esse fato torna mais difícil o diagnóstico e o manejo clínico da doença, permanecendo ainda sem resposta a latência do fungo no parênquima cerebral, uma vez que os estudos tomográficos mostram manutenção ou piora das imagens na fase supressiva do tratamento. Desta forma o objetivo é induzir a remissão o mais rapidamente

possível, seguindo-se o tratamento supressor à longo prazo (LEDINGHAM & WARRELL, 2000).

A concentração dos antifúngicos no SNC pode estar sensivelmente diminuída, de modo a permitir a multiplicação da levedura no parênquima cerebral, então a quantificação desses fármacos no líquido cefalorraquidiano pode contribuir para o sucesso terapêutico. O monitoramento do fármaco no sangue permite substituir o tratamento empírico pela terapia “dose ajustada”; além disso, o monitoramento das concentrações líquóricas permite a avaliação da penetração do fármaco no SNC de forma a se atingir a eficácia do tratamento e minimizar os efeitos adversos do fluconazol nesses pacientes.

3 - OBJETIVOS

3.1 Principal

- Realizar o monitoramento das concentrações no plasma e no LCR da anfotericina B e do fluconazol, bem como investigar a penetração no SNC desses antifúngicos nos pacientes portadores de meningite criptocócica e AIDS.

3.2 Secundários

- Desenvolver e validar método bioanalítico para determinação da anfotericina B e fluconazol em matrizes biológicas através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV/VIS).

- Investigar a razão das concentrações líquido/plasma para utilização no estudo da penetração desses antifúngicos no SNC dos pacientes.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Validação de método analítico

Na validação para a análise quantitativa de anfotericina B e fluconazol, consideraram-se os parâmetros especificidade, limite de detecção e quantificação, linearidade, curva de calibração, recuperação absoluta e relativa, precisão e exatidão (intra-dia e inter-dias), estabilidade, bem como a robustez do método analítico, de acordo com Bressolle e col (1996) e ANVISA (BRASIL, 2003). Os resultados obtidos foram expressos através da média, desvio padrão da média, erro padrão da média e coeficiente de variação.

4.1.1 Especificidade

O parâmetro evidencia a capacidade do método em identificar e quantificar o analito na presença de outros componentes da amostra (BRESSOLLE, 1996; BRASIL, 2003). Analisaram-se amostras de plasma obtidas de seis indivíduos, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada. Cada amostra branco foi testada utilizando o procedimento e as condições cromatográficas propostas neste estudo. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com solução aquosa do analito, em concentração próxima ao LQ. Qualquer amostra de branco testada que apresentasse

interferência no tempo de retenção do fármaco ou padrão interno, foi rejeitada. Caso uma ou mais das amostras analisadas apresentassem tal interferência, novas amostras de outros seis indivíduos seriam testadas.

Relativamente a seletividade, considerou-se a presença de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco inferior num percentual de 20% da resposta do LQ. Para os picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno considerou-se o limite inferior a 5% da resposta na concentração utilizada do mesmo no ensaio de quantificação do analito.

4.1.2 Limite de Detecção e Quantificação

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente numa amostra que pode ser diferenciada, de forma confiável, do ruído de fundo sob as condições experimentais estabelecidas (BRESSOLLE, 1996; BRASIL, 2003). Para estabelecer este parâmetro, utilizaram-se, decrescentemente, concentrações do fármaco até o menor nível detectável.

O limite de quantificação representa a menor quantidade do analito numa amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (<20%) sob as condições experimentais estabelecidas (BRESSOLLE, 1996; BRASIL, 2003). O valor do Limite de quantificação deve ser o dobro do valor do limite de detecção (BRESSOLLE, 1996). Os limites de detecção e quantificação foram determinados baseados na verificação de precisão e exatidão na análise de 10 replicatas.

4.1.3 Linearidade

É a capacidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Representa a faixa de concentração que evidencia boa correlação linear entre resposta mensurada (Y, a área do pico ou razão das áreas do fármaco e o padrão interno medidos através do instrumento analítico), e as respectivas concentrações plasmáticas do fármaco inalterado ou biotransformado (X). A equação dessa reta é representada por $Y = aX + b$, estabelecendo-se boa correlação linear entre Y e X; cujo coeficiente de correlação linear é representado por r^2 (BRESSOLLE, 1996; BRASIL, 2003).

4.1.4 Curva de calibração

A curva de calibração deve ser construída diariamente, deve ser preparada através das soluções padrão adicionadas de plasma branco em no mínimo seis concentrações, incluindo o LQ e uma amostra branco, ou seja, de plasma isento do fármaco e do padrão interno. Deve-se plotar o valor nominal (x) para cada concentração plasmática do fármaco *versus* a respectiva razão da área (y) do pico obtida deste fármaco e seu padrão interno, obtendo-se o coeficiente de correlação linear ($r^2 \geq 0,98$) e sua equação respectiva ($y = ax + b$), em que “a” é o coeficiente angular e “b” é o intercepto da reta (BRASIL, 2003).

Os controles de qualidade internos em concentração alta, média e baixa foram preparados em duplicata e analisados durante cada corrida analítica para garantir a aceitação da curva de calibração do dia. Uma corrida foi aceita quando pelo menos quatro

dos seis controles mostraram um desvio comparado com o seu valor nominal menor que 15%. Uma vez aceita, a curva de calibração foi utilizada para a quantificação do fármaco nas amostras dos pacientes estudados neste protocolo clínico.

4.1.5 Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de purificação de um método analítico dentro de um limite de variação. Corresponde à razão do dado obtido pela análise de amostra submetida ao procedimento de purificação e do dado obtido pela análise de injeção direta de solução do analito. Porcentagens de recuperação do fármaco e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata (BRESSOLLE, 1996; BRASIL, 2003).

A recuperação foi realizada comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta), em cinco replicatas contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação.

4.1.6 Exatidão

A exatidão é avaliada através do desvio obtido entre o valor nominal da concentração do fármaco na amostra e o valor obtido pelo método analítico (BRASIL, 2003).

A exatidão do método foi avaliada utilizando três concentrações (baixa, média e alta) em seis replicatas no mesmo ensaio (exatidão intra-dia) e em quatro dias consecutivos (exatidão inter-dias), aceitam-se os desvios inferiores a 15%.

$$\text{Exatidão} = 100 - \{[(\text{nominal} - \text{obtido})/\text{nominal}] \cdot 100\}$$

4.1.7 Precisão

Precisão representa a reprodutibilidade dos resultados obtidos pela análise quantitativa da mesma amostra em idênticas condições de ensaio (BRASIL, 2003).

A precisão foi avaliada baseada em análises de três concentrações (baixa, média e alta) em 6 replicatas no mesmo ensaio (precisão intra-dia) e em quatro dias consecutivos (precisão inter-dias). O resultado obtido foi expresso em porcentagem através do coeficiente de variação, não se admitindo valores superiores a 15%, de acordo com a equação abaixo:

$$\text{CV\%} = \frac{\text{DP} \times 100}{\text{CMD}}$$

Onde: DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada.

4.1.8 Estabilidade

O parâmetro de estabilidade é fundamental para determinar se um analito manteve-se quimicamente inalterado numa dada matriz, sob condições específicas, num determinado período (BRASIL, 2003).

Para a determinação da estabilidade do fármaco nas matrizes biológicas adotou-se como um critério aceitável para todas as concentrações estudadas, a percentagem inferior a 15% de variação, sendo fundamental que as condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. O coeficiente de variação e erro sistemático foram estimados. Os resultados obtidos foram expressos em percentagem do valor nominal. A análise da estabilidade consistiu na avaliação:

- Ciclos de congelamento: realizado após três ciclos de descongelamento do fármaco nas matrizes biológicas em três concentrações diferentes, analisaram-se em triplicata e em 3 dias consecutivos. As amostras foram congeladas à -20°C e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente na bancada. Quando completamente descongeladas, alíquotas das matrizes biológicas foram retiradas para cada ciclo, sendo novamente congeladas por outras 24 horas e assim sucessivamente, até contemplar os três ciclos. Após o término do terceiro ciclo, o fármaco foi quantificado nas matrizes biológicas procedentes dos ciclos 1, 2 e 3 utilizando-se uma curva de calibração do dia que foi aceita através dos controles de qualidade internos. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos pela análise das alíquotas das amostras recém-preparadas.
- Tempo e condição da análise: foi determinada a partir de amostras extraídas em triplicata e em três concentrações, mantidas a temperatura ambiente na bandeja do auto injetor, durante o tempo máximo de 24 horas, no qual a amostra permanece sob esta condição.
- Longa duração, após nove meses: as amostras estocadas foram descongeladas e analisadas em três concentrações diferentes, em triplicata.

4.1.9 Robustez

A robustez do método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante sua aplicação (BRESSOLLE, 1996; BRASIL, 2003).

A robustez foi determinada após análise de três concentrações diferentes em 6 replicatas, utilizando-se duas colunas analíticas C18 (mesma marca e lotes diferentes), e considerando-se ainda pequenas variações na proporção dos constituintes e no fluxo da fase móvel; os resultados foram expressos através do coeficiente de variação para a precisão e erro sistemático na exatidão.

4.2 Desenvolvimento de método analítico para quantificação de anfotericina B em plasma e líquido

4.2.1 Reagentes, soluções e padrões de referência

Utilizou-se padrão secundário de anfotericina B na análise cromatográfica gentilmente cedido pela Bristol-Myers Squibb (New York, NY, USA). Em sala de luz amarela, num balão de 10 mL pesaram-se 10mg de anfotericina B (armazenada na geladeira e protegida de luz), que foram em seguida dissolvidos com água purificada (UP) contendo 100µL de hidróxido de sódio 0,5M/10mL solução final. Este volume de alcalinizante foi requerido para a dissolução completa do fármaco a temperatura ambiente. A partir desta solução estoque de anfotericina B na concentração de 1mg/mL, prepararam-se diluições em plasma para obtenção dos calibradores nas seguintes

concentrações 100, 50, 25; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6; 0,8 e 0,2 µg/mL. Os controles de qualidade internos foram preparados nas concentrações de 10; 5 e 0,5 µg/mL. Utilizou-se p-nitrofenol como padrão interno, preparando-se a solução padrão estoque na concentração de 1mg/mL, e a solução de uso na concentração de 100µg/mL, ambas em metanol; alíquotas de 25 µL foram requeridas por ensaio realizado.

A anfotericina B foi determinada no plasma através de cromatografia líquida de alta eficiência. Assim alíquotas de plasma branco previamente testado, calibradores, controles internos e amostras dos pacientes foram analisadas em paralelo diariamente.

O nitrogênio utilizado na evaporação do solvente dos extratos orgânicos, e o hélio destinado a desgaseificação da fase móvel da cromatografia apresentavam grau de pureza 99,99%, procedência Air Products Gases Industriais LTDA (AIR PRODUCTS, SP, Brasil).

Obteve-se água ultrapura através dos sistemas MilliDI® e Simplicity®, (MILLIPORE SP, Brasil) na preparação da fase móvel de cromatografia, na limpeza da tubulação e coluna analítica de separação bem como na regeneração do cromatógrafo líquido. Lavou-se toda a vidraria, e demais materiais utilizados na purificação e na cromatografia pela imersão com água corrente e detergente, Extran Alcalino® (MERCK, SP, Brasil) seguida de lavagem em solução ácida por imersão durante 2 horas em HCL 50%, posteriormente enxágüe com água corrente e destilada e descarte em adequado.

4.2.2 Procedimento de Purificação

A quantificação da anfotericina B no plasma e líquido utilizou volume reduzido da matriz biológica foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no comprimento de onda 385nm. Todos os procedimentos, inclusive a pesagem

do padrão secundário foram realizados em laboratório de luz amarela para garantir sua proteção.

Para a determinação da anfotericina B no plasma e no líquido utilizou-se procedimento de precipitação de proteínas com acetonitrila. Desta forma, alíquotas de 25 µL de padrão interno *p*-nitrofenol solução metanólica (100µg/mL) foram adicionados a tubos de eppendorf, e o solvente evaporado a secura sob fluxo de nitrogênio em banho-maria 37°C. Na sequência, foram adicionados 200 µL dos calibradores, ou controles internos ou ainda as amostras de plasma e líquido procedentes dos pacientes e 600 µL de acetonitrila. Imediatamente após, realizou-se a precipitação das proteínas através de agitação em vortex durante 10 segundos. Centrifugaram-se os tubos a 6.000g durante 40 minutos em centrífuga CF15R (HITACHI, Kyoto, Japão). Transferiram-se 400 µL do sobrenadante para tubo cônico que foi concentrado a secura sob fluxo de nitrogênio em banho-maria 37°C. Em seguida, o extrato seco foi dissolvido com 200 µL de solução de lavagem (acetonitrila : água purificada, 8:2, v/v) e volumes de 5 µL foram injetados automaticamente no cromatógrafo líquido, fluxograma ilustrado a seguir.

DETERMINAÇÃO DE ANFOTERICINA B EM PLASMA E LCR FLUXOGRAMA

Instrumento: Cromatógrafo líquido SHIMADZU LC-10A; bomba LV10AD, controladora CBM 101, detector SPD 10AV 385nm, autoinjeter Sil 10DVP, registrador-integrador CR6A, software LC Class vp

Condições cromatográficas:

Coluna: NovaPak C18, 150x3,9mm; 4 micron.

Fase Móvel: Tampão acetato 0,1M pH 5 e acetonitrila (50:50 v/v) em fluxo: 0,5 mL/min

Solução de lavagem: Acetonitrila e água UP (8:2,v/v)

4.2.3 Análise cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando detector UV-Visível, em cromatógrafo líquido LC-10^A com software Class vp (SHIMADZU, Kyoto, Japão), coluna de fase reversa tipo C18, (150x3.9mm, comprimento x diâmetro interno) Novapack® C18 (WATERS ASSOC. Milford, USA) de 5 micra, adaptada a uma pré-coluna C18 (WATERS ASSOC. Milford, USA). A fase móvel binária foi constituída de tampão acetato 0,1M, pH 5,0 e acetonitrila (50:50 v/v), sob vazão de 0,5 mL/min, em sistema isocrático de eluição a temperatura ambiente. Os picos dos compostos foram monitorados através de um detector SPD 10AV (SHIMADZU, Kyoto, Japão) no comprimento de onda de 385nm. Também foram utilizados a controladora SCL-10AVP (SHIMADZU, Kyoto, Japão) e o autoinjeter SIL 10ADVP (SHIMADZU, Kyoto, Japão). A integração da área dos picos foram realizados num registrador-integrador Chromatopac CR-6A, (SHIMADZU, Kyoto, Japão).

4.3. Desenvolvimento de método analítico para quantificação de fluconazol em plasma e LCR

4.3.1 Reagentes, soluções e padrões de referência

O fluconazol utilizado como padrão na análise quantitativa por cromatografia foi adquirido da Sigma (SIGMA ALDRICH, St. Louis, USA). A solução estoque (metanólica) de fluconazol foi preparada na concentração inicial de 10mg/mL. A partir da solução estoque, preparou-se a solução intermediária em plasma (500µg/mL), e realizou-se diluição em série com plasma para a obtenção dos calibradores nas concentrações 250;

100; 50; 25; 12,5; 6,2; 3,1; 1,5 e 0,2 µg/mL. Os controles de qualidade internos foram preparados nas concentrações de 20, 10 e 1,6 µg/mL.

A carbamazepina utilizada como padrão interno foi adquirida de Sigma (SIGMA ALDRICH, St. Louis, USA). A solução (metanólica) estoque padrão foi preparada inicialmente na concentração de 10 µg/mL. A solução padrão de adição foi preparada de forma a obter 1µg/mL em plasma e a tomada de ensaio foi de 25 µL por ensaio.

O fluconazol nas matrizes biológicas foi determinado através da cromatografia líquida de alta eficiência após adição de padrão interno seguida de alcalinização e extração líquido-líquido com diclorometano. Assim, alíquotas de plasma branco, calibradores, controles internos e amostras dos pacientes foram analisados em paralelo diariamente.

Todos os reagentes e soluções empregados para esse método, tais como nitrogênio utilizado na evaporação do solvente dos extratos orgânicos, o hélio destinado a degaseificação da fase móvel da cromatografia, a água ultrapura, bem como os procedimentos adotados na lavagem de vidrarias foram os mesmo utilizados para o método descrito anteriormente para a anfotericina B.

4.3.2 Procedimento de extração

A quantificação do fluconazol em volume reduzido da matriz biológica foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência, detecção na região ultravioleta empregando método desenvolvido e validado no Laboratório de Farmacoterapia do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP para o monitoramento das concentrações plasmáticas e líquóricas do fluconazol nos intervalos de dose dos pacientes.

Para essa determinação, utilizou-se extração simples líquido-líquido conforme descrito a seguir. Transferiu-se para tubo de extração: 25 µL de PI (carbamazepina em plasma na concentração de 1,0 µg/mL), 200µL de matriz biológica e 50 µL NaOH 1,25 M para alcalinização. A mistura foi agitada em vortex por 15 segundos e adicionaram-se 3mL de diclorometano como solvente extrator. A mistura foi novamente agitada em vortex por 1 minuto, seguida de centrifugação a 3000 g por 40 minutos a 4° C. O sobrenadante foi aspirado e descartado e o tubo contendo a fase orgânica remanescente foi imerso em banho de nitrogênio líquido. A fase orgânica foi cuidadosamente transferida para tubos cônicos, e o solvente evaporado em banho-maria, sob corrente de nitrogênio a 37°C. Em seguida, o extrato seco foi dissolvido com 200 µL de fase móvel e volumes de 20 µL foram injetados automaticamente no cromatógrafo líquido (Fluxograma 2).

DETERMINAÇÃO DE FLUCONAZOL EM PLASMA E LCR FLUXOGRAMA

Instrumento: Cromatógrafo líquido SHIMADZU LC-10A; bomba LV10AD, controladora CBM 101, detector SPD 10AV 210nm, autoinjeter Sil 10DVP, registrador-integrador CR6A, software LC10 Class vp

Condições cromatográficas:

Coluna: NovaPak C18, 150x3,9mm; 4 micron.

Fase Móvel: Água UP e acetonitrila (70:30 v/v) em fluxo: 0,5 mL/min, 210nm

4.3.3 Análise cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência e detector UV, em cromatógrafo líquido LC-10A, (SHIMADZU, Kyoto, Japão) utilizando coluna de fase reversa (150x3.9mm, comprimento x diâmetro interno) C18 Novapak® (WATERS ASSOC. Milford, USA) de 4 micra, adaptada a uma pré-coluna C18 Novapak®, 4 x 4mm (WATERS ASSOC. Milford, USA). A fase móvel binária foi constituída de água UP e acetonitrila (70:30 v/v), sob vazão de 0,5 mL/min, em sistema isocrático de eluição a temperatura ambiente. Os picos referentes aos compostos de interesse foram monitorados através de um detector UV (SHIMADZU, Kyoto, Japão) no comprimento de onda de 210 nm. Utilizou-se controladora CBM 101 e autoinjeter SIL 10ADVP (SHIMADZU, Kyoto, Japão). A integração da área dos picos do fluconazol e padrão interno foi realizada utilizando registrador-integrador Chromatopac CR-6A (SHIMADZU, Kyoto, Japão).

4.4 Protocolo clínico

4.4.1 Casuística

Os pacientes internados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), portadores de meningite criptocócica e AIDS, foram alocados para a realização da etapa clínica com duração de um ano. Investigaram-se vinte e um pacientes de ambos os sexos, internados com idade superior a 18 anos, portadores de meningite criptocócica e AIDS, com indicação clínica de tratamento com anfotericina B e fluconazol. Realizou-se o monitoramento dos pacientes no intervalo de dose, para a investigação das

concentrações plasmáticas e líquóricas de anfotericina B e fluconazol após farmacoterapia de alta dose na fase aguda da doença que teve duração de até 12 semanas para os pacientes internados.

4.4.2 Critérios de inclusão no estudo

- Pacientes de ambos os sexos
- Com diagnóstico de meningite criptocócica e AIDS em tratamento
- Idade superior a 18 anos
- Internados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER)
- Com indicação de fluconazol em alta dose (800mg ao dia)
- Com indicação de anfotericina B em alta dose (1mg/Kg ao dia)

4.4.3 Critérios de exclusão no estudo

- Pacientes com diagnóstico de meningite criptocócica e AIDS não tratados
- Pacientes que evoluíram para óbito até o segundo dia de tratamento
- Pacientes com outra infecção oportunista de SNC associada à doença
- Pacientes gestantes
- Pacientes com Insuficiência Renal

4.4.4 Considerações éticas

Os sujeitos que preencheram os critérios de inclusão e exclusão do estudo foram convidados a participar do referido projeto de pesquisa. Nestes casos, os pacientes ou seus representantes legais receberam todas as informações referentes ao estudo, em linguagem clara e acessível, incluindo justificativa e objetivos, procedimentos realizados, riscos, benefícios e procedimentos alternativos.

Os pacientes ou seus representantes legais também foram informados sobre a possibilidade de retirar o seu consentimento em qualquer momento sem que isto trouxesse prejuízos a continuidade da assistência a saúde; disponibilidade de assistência no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa; salvaguarda da confidencialidade, sigilo, privacidade e acesso a informações atualizadas a qualquer tempo.

Todos os pacientes ou seus representantes legais dispuseram do tempo necessário de ler o termo de consentimento e esclarecer possíveis dúvidas em relação ao estudo. Caso o paciente ou seu representante legal concordasse em que o sujeito participasse do estudo, o termo de consentimento foi preenchido com letra legível e assinado pelo mesmo ou seu representante legal e pelo pesquisador clínico responsável pelo acompanhamento dos pacientes, Dra. Mara Cristina da Silva Martins Pappalardo, CRM 39505. O termo foi elaborado em duas vias, sendo uma entregue ao paciente ou seu responsável legal e a outra arquivada juntamente com a documentação do paciente.

O protocolo de estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética em Pesquisa (CEP) das Instituições envolvidas no projeto (APENDICE). Antes de serem incluídos no estudo, os pacientes ou seus representantes legais forneceram consentimento informado por escrito, TCLE (Termo de consentimento livre e esclarecido), após receberem todas as informações referentes ao estudo, previamente aprovado pelos CEPs (APÊNDICE).

4.4.5 Medicação e administração de anfotericina B

Considerando-se o tratamento com anfotericina B, os pacientes receberam a medicação injetável através de infusão rápida na dose 1mg/kg, considerada terapia de alta dose para o controle da meningite causada pelo *Cryptococcus neoformans*. Relativamente a medicação, escolheu-se a forma convencional de dispersão coloidal que é adquirida nos hospitais públicos. Administrou-se a anfotericina B sob a forma injetável uso hospitalar através da formulação Fungizon® (BRISTOL MYERS SQUIBB, SP, Brasil) que foi armazenada em geladeira, e contém anfotericina B cristalina (50 mg) acrescida dos seguintes componentes inativos: fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, cloreto de sódio e deoxicolato de sódio, sendo que este último permite a reconstituição da anfotericina B sob a forma coloidal fornecendo uma solução concentrada de 5mg/mL; a solução concentrada assim preparada se não utilizada imediatamente deve ser armazenada ao abrigo da luz e a temperatura ambiente durante até 24 horas, ou então, em geladeira por uma semana. Previamente a administração, a solução concentrada de anfotericina B (5 mg/mL) foi diluída a 0,1mg/mL com soro glicosado 5% e administrada na dose de 1 mg/kg através de infusão durante 4 horas, uma vez ao dia. A solução diluída foi utilizada imediatamente após a diluição sem qualquer risco de degradação e sem necessidade de proteção da luz, sendo que o material excedente não utilizado foi descartado conforme a recomendação do fabricante.

4.4.6 Medicação e administração de fluconazol

O fluconazol constou de solução para administração intravenosa uso hospitalar Sistema Viaflex®(PFIZER, SP, Brasil) sendo constituído por embalagens contendo 6

bolsas plásticas com 100mL (2mg/mL). A medicação na dose de 400mg 12/12 horas que foi administrada aos pacientes através da formulação Zoltec® (PFIZER, SP, Brasil) armazenada em geladeira, e contém fluconazol (2 mg) acrescido dos seguintes componentes inativos: cloreto de sódio e água para injetável; obtendo solução de fluconazol na concentração de 2 mg/mL em salina 0,9%. A solução apresentada nas bolsas plásticas foi administrada a uma velocidade que não excedeu 10mL/minuto segundo recomendação do fabricante; cada 200 mg do fluconazol contidos em 100 mL de salina contém 15 mmol de Na^+ e de Cl^- . Desta forma, considera-se ainda a velocidade de administração para os pacientes que requeiram restrição de sódio e líquidos. Segundo a recomendação do fabricante a solução para infusão intravenosa é compatível com a administração dos seguintes fluidos:

- Dextrose 10%
- Solução de Ringer
- Solução de Hartmann
- Cloreto de potássio em glicose
- Bicarbonato de sódio 4,2%
- Aminofusina
- Solução salina

Adicionalmente, segundo recomendação do fabricante, alguns cuidados especiais devem ser tomados antes da administração da infusão intravenosa apresentada nas bolsas plásticas Sistema Viaflex ®(PFIZER, SP, Brasil); a medicação acondicionada foi mantida na temperatura entre 5-25° C, não podendo ser congelada ou exposta a calor excessivo. A bolsa de forma geral vem armazenada dentro de uma embalagem externa “strip” que deve ser removida somente no momento do uso. O strip é uma barreira que previne contra a umidade e mantém a esterilidade do produto.

O critério de substituição da anfotericina B pelo fluconazol no tratamento está baseado no aparecimento de reações tais como vermelhidão permanente no local das injeções, ou alterações cardíaca e renal desencadeadas pela anfotericina B; nesse caso faz-se necessária a substituição completa desse antifúngico pelo fluconazol intravascular. Essa substituição parcial ou completa pelo fluconazol até o momento é empírica no tratamento desse tipo de paciente.

4.4.7 Monitoramento terapêutico de antifúngicos nos pacientes com meningite criptocócica

Coletaram-se amostras sangüíneas para cada paciente (3mL/coleta), no período de até 12 semanas de terapia antifúngica, não excedendo 80 mL de sangue por paciente em todo o seguimento. Adicionalmente, para o alívio dos sintomas decorrentes da hipertensão intracraniana, coletaram-se amostras de LCR, procedimento esse efetuado por especialista; estas amostras foram utilizadas ainda para pesquisa do agente etiológico, cultura e quantificação dos antifúngicos em estudo.

Na maioria dos casos de meningite criptocócica e AIDS, os pacientes evoluíram para pressão intracraniana elevada levando a uma crise de hipertensão e consequentemente foram submetidos a punção do líquido cefalorraquidiano para evitar as complicações.

4.4.7.1 Justificativa de punção lombar

Em alguns casos de meningite criptocócica e AIDS os pacientes podem evoluir para pressão intracraniana elevada levando a hipertensão intracraniana (HIC) e o clínico nesse caso se baseia em alguns sintomas típicos: cefaléia, visão turva, tontura enjôo e vômitos; se esta complicação não for tratada, o paciente poderá ter várias seqüelas tais como surdez e cegueira.

No suporte laboratorial específico de seguimento no tratamento dos pacientes: previu-se a realização de exame direto, hemocultura e urocultura para fungos, pesquisa de antígenos polissacarídicos e a cultura de líquido que foram realizados no IIER. A identificação da espécie, variedade e sensibilidade a antifúngicos foram realizados na Seção de Micologia do Serviço de Parasitologia, Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz (IAL).

A quantificação dos fármacos anfotericina B e fluconazol nas matrizes biológicas (sangue e LCR) foi baseada na aplicação do métodos bioanalíticos validados para estudo dos pacientes em terapia de alta dose com esses dois antifúngicos.

4.4.7.2 Análise de riscos e benefícios

Os riscos decorrentes do estudo, relacionados com a coleta de sangue foram mínimos, podendo haver a ocorrência de hematoma no local da punção na coleta de amostras sanguíneas. Relativamente a coleta de LCR, os riscos são considerados mínimos por causar incômodo na punção lombar, provocando dor local passageira.

Além disso, a coleta de líquido foi prevista na avaliação do paciente sempre que o mesmo evidenciou sinais de pressão intracraniana aumentada não havendo portanto

nenhuma alteração nos procedimentos de rotina empregados nestes casos, tampouco foram introduzidos novos procedimentos em função do estudo. Vale a pena ressaltar que a coleta de LCR foi efetuada por especialista no hospital, conforme procedimento previamente estabelecido na unidade.

Como benefício para o paciente a partir do seguimento de casos da doença em fase de difícil controle, o desenvolvimento deste protocolo buscou evidenciar se a penetração é satisfatória ou não a partir da dose utilizada para esses antifúngicos administrados em associação.

4.4.7.3 Critérios para suspender ou encerrar a pesquisa

Este estudo deveria ser encerrado ou suspenso, caso fosse observado algum risco ou dano à saúde do sujeito participante da pesquisa, conseqüente da mesma e não previsto. Do mesmo modo, caso fosse constatada a superioridade de qualquer outro método alternativo para o tratamento da meningite criptocócica associada à doença de AIDS, o estudo também seria suspenso. O presente estudo foi finalizado dentro dos prazos previstos no cronograma para todas as etapas clínica, analítica e estatística.

4.4.7.4 Medidas de proteção de risco e confidencialidade

Como medida de proteção dos eventuais riscos previu-se a suspensão imediata da pesquisa no caso de algum risco ou dano à saúde do paciente conseqüente da mesma e que não estivesse previsto. Além disso, embora não se tenha registrado nenhum acidente ou dano a saúde, o pesquisador clínico e a instituição (IIER) foram os

responsáveis por prestar assistência integral às possíveis complicações e danos previstos aos sujeitos da pesquisa.

Todos os esforços foram realizados para garantir a confidencialidade dos sujeitos incluídos neste projeto de pesquisa. Todas as informações coletadas durante o estudo foram identificadas através das iniciais do paciente e de um número de alocação seqüencial, sendo que em nenhum momento a identidade dos pacientes foi revelada.

5 – RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de anfotericina B em plasma e líquido

Evidenciou-se boa seletividade e especificidade na determinação de anfotericina B e do padrão interno em 385 nm, Figura 1. O tempo requerido para cada corrida cromatográfica foi de 15 minutos, suficiente para a análise de grande número de amostras dos pacientes.

Figura 1. Perfil cromatográfico CLAE- UV/VIS, 385nm. Cromatogramas: plasma branco (A), calibrador (B). Picos: 1) p-nitrofenol (padrão interno) em 3,5 minutos, (2) anfotericina B em 5,3 minutos.

Evidenciou-se linearidade na faixa de 0,2 a 25 $\mu\text{g/mL}$ para concentração da anfotericina B em plasma e ótimo coeficiente de correlação linear ($r^2=0,9999$), Tabela 1.

Evidenciaram-se limites de detecção de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (LD) e de quantificação equivalente a 0,2 $\mu\text{g/mL}$ (LQ).

As áreas dos picos foram integradas para anfotericina B e padrão interno e a razão de área *versus* o valor nominal das concentrações foram plotados na construção da curva de calibração diária a partir de 7 pontos, Figura 2.

Figura 2. Linearidade e curva de calibração diária para o anfotericina B em plasma (0,2 – 25 µg/mL) utilizando a *p*-nitrofenol como padrão interno.

O método desenvolvido apresentou sensibilidade satisfatória (LQ: 0,2 µg/mL, LD: 0,1 µg/mL) além de linearidade, exatidão e precisão aceitáveis (Tabela 1). Os estudos de estabilidade incluindo os ciclos de congelamento são referidos na Tabela 2.

Tabela 1: Limites de confiança do método de determinação de anfotericina B em plasma

Parâmetro	Resultado obtido
Linearidade	0,2 to 25,0 µg/ml
Coeficiente de correlação linear	$r^2 = 0,9999$
Limite de quantificação	0,2 µg/ml
Limite de detecção	0,1 µg/ml
Recuperação absoluta	97%
Recuperação relativa	101%
Precisão	
Intra-dia	5,4%
Inter-dias	6,0%
Exatidão (erro sistemático)	
Intra-dia	3,3%
Inter-dias	2,2%

Tabela 2: Estudos de estabilidade da anfotericina B em plasma

Exatidão		Precisão
Estabilidade após ciclos de congelamento		
Ciclo I	0,2%	5,4%
Ciclo II	1,3%	8,8%
Ciclo III	5,6%	8,2%
Estabilidade curto prazo (bandeja)		
	1,0%	3,0%

Exatidão foi expressa através do erro sistemático

5.2 Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de fluconazol em plasma e líquido

Uma vez que os componentes endógenos foram eluídos com o solvente durante o primeiro minuto, não se registrou presença de picos que pudessem interferir no perfil cromatográfico do analito e se padrão interno. O fluconazol e o PI (carbamazepina) foram eluídos pela coluna cromatográfica conforme ilustrado na Figura 3. Garantiu-se alta seletividade e o tempo requerido para cada corrida cromatográfica foi de 15 minutos.

Figura 3. Perfil cromatográfico pela análise do fluconazol. Cromatogramas: plasma branco (A), calibrador (B). Picos: (1) fluconazol em 3,6 minutos, (2) carbamazepina (padrão interno) em 10,7 minutos.

Registrou-se linearidade na faixa de 0,2 a 250 µg/mL de concentração do fluconazol em plasma e ótimo coeficiente de correlação linear, $r^2=0,9998$, Tabela 3. Obtiveram-se limites de detecção (LD) de 0,1 µg/mL e de quantificação (LQ) de 0,2 µg/mL. As áreas dos picos foram integradas para fluconazol e PI; e a razão de área *versus* o valor nominal das concentrações foram aplicados na construção da curva de calibração diária a partir de 9 pontos para a determinação do fluconazol em plasma, Figura 4.

Figura 4. Linearidade e curva de calibração diária (0,2-250 µg/mL) do fluconazol em plasma, utilizando a carbamazepina como padrão interno.

O método desenvolvido apresentou alta sensibilidade (LQ = 0,2 µg/mL e LD = 0,1 µg/mL), linearidade, recuperação e estabilidade com exatidão e precisão aceitáveis; além de robustez garantida, Tabela 3. A estabilidade do analito exceto para as soluções padrão foi investigada e os resultados estão reunidos na Tabela 4.

Tabela 3: Limites de confiança do método para determinação de fluconazol no plasma

Parâmetro	Resultado obtido
Linearidade	0,2 to 250,0 µg/ml
Coeficiente de correlação linear	$r^2 = 0,9998$
Limite de quantificação	0,2 µg/ml
Limite de detecção	0,1 µg/ml
Recuperação absoluta	98%
Recuperação relativa	100%
Precisão CV%	
Intra-dia	0,5%
Inter-dias	-1,3%
Erro sistemático	
Intra-dia	1,2%
Inter-dias	1,2%
Robustez CV%	
Precisão	2,5%
Erro sistemático	2,8%

CV%: coeficiente de variação. Exatidão foi expressa através do erro sistemático

Tabela 4: Estabilidade do fluconazol em plasma

	Erro sistemático	Precisão
Estabilidade (após ciclos de congelamento e descongelamento)		
Ciclo I-III	- 1,3	1,2%
Estabilidade curta duração (bandeja, 20° C, 24 horas)		
	-1,8%	4,8%
Estabilidade de longa duração em congelador -20° C, 9 meses		
	5,7%	6,7%
Exatidão foi expressa através do erro sistemático		

5.3 Monitoramento Terapêutico

5.3.1 Anfotericina B no plasma e líquido dos pacientes e penetração no SNC

Reporta-se para a anfotericina B que a dose de 0,5 mg/kg alcança picos plasmáticos entre 1,0 e 1,5µg/mL ao término da infusão de 4 horas que decaem para vales de 0,5 a 1,0 µg/mL imediatamente antes da dose subsequente, isto é, na 24^a hora. Como doses mais altas são requeridas para os pacientes portadores de meningite criptocócica com a doença de AIDS, utiliza-se 1mg/kg que deveria alcançar picos de 2,0 a 3,0 µg/mL e vales variando entre 1,0 e 2,0 µg/mL (DRUTZ, 1992).

No presente estudo, a concentração da anfotericina B no plasma dos 21 pacientes investigados alcançou níveis plasmáticos de vale equivalentes à 2,30+/-0,56 µg/mL, média e erro padrão da média, que variou entre 0,02 – 5,08µg/mL (IC95%) Tabela 5. As concentrações do fármaco no LCR para esses pacientes foi de 0,30+/- 0,02 µg/mL e o IC95% variou entre 0,19-0,36µg/mL, Tabela 5. A penetração do antifúngico no SNC foi

estimada através da razão LCR/plasma expressa em percentagem fornecendo os valores médios, e erro padrão da média de $0,20 \pm 0,02$, Tabela 5. A faixa de variação encontrada para a penetração do antifúngico no SNC foi expressa através do IC95% que forneceu valores de 0,10-0,27 para a razão LCR/plasma. A alta penetração obtida frente aos dados reportados anteriormente pode ser atribuída a maior ou menor gravidade do caso uma vez que na meningite ocorrem alterações da permeabilidade da barreira.

Tabela 5. Concentração de Anfotericina B no plasma e LCR de pacientes portadores de meningite criptocócica, n=21, 1mg/Kg uma vez ao dia, infusão intravenosa de 4 horas.

Concentração	Plasma $\mu\text{g/mL}$	LCR $\mu\text{g/mL}$	*Razão
Média+/- EPM	$2,30 \pm 0,56$	$0,30 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,02$
LI-LS (IC95%)	0,02-5,08	0,19-0,36	0,10-0,27

(*): razão LCR/plasma; EPM, erro padrão da média; IC, intervalo de confiança; LIIC95%, limite inferior do intervalo de confiança; LSIC95%, limite superior do intervalo de confiança

5.3.2 Fluconazol no plasma e líquido dos pacientes e penetração no SNC

Reporta-se para o fluconazol que dose de 100 mg, 12/12 horas alcança picos plasmáticos de 4,0 a 8,0 $\mu\text{g/mL}$ ao término da infusão de 1 hora decaindo para 0,5 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ imediatamente antes da dose subsequente, isto é na 12^a hora. Como nos pacientes portadores de meningite criptocócica e a doença de AIDS altas doses são requeridas, utiliza-se 800mg ao dia que deveria alcançar picos ao redor de 100 $\mu\text{g/mL}$ e vales variando entre 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ (COUSIN *et al.*, 2003).

A concentração do fluconazol no plasma dos 21 pacientes investigados alcançou níveis de vale equivalentes à $31,7 \pm 5,9 \mu\text{g/mL}$, média e erro padrão da média,

variando entre 20,1 e 43,3 $\mu\text{g/mL}$ IC95%, Tabela 6. As concentrações do fármaco no LCR para esses mesmos pacientes, expressa através da média e intervalo de confiança, foi de 19,4 $\pm$ 4,3 $\mu\text{g/mL}$ e erro padrão da média, com intervalo de confiança 95% de 11,1 a 27,7 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 6. Concentração de fluconazol no plasma e LCR de pacientes portadores de meningite criptocócica, n=21, recebendo infusão de 400mg duas vezes ao dia.

Concentração	Plasma $\mu\text{g/mL}$	LCR $\mu\text{g/mL}$	*Razão
Média $\pm$ EPM	31,7 $\pm$ 5,9	19,4 $\pm$ 4,3	0,67 $\pm$ 0,10
LI-LS (IC95%)	20,1 – 43,3	11,1 – 27,7	0,47- 0,87

(*): razão LCR/plasma; EPM, erro padrão da média; IC, intervalo de confiança; LIIC95%, limite inferior do intervalo de confiança; LSIC95%, limite superior do intervalo de confiança

A penetração do antifúngico no SNC foi estimada através da razão LCR/plasma fornecendo valores médios, e erro padrão da média de 0,67 $\pm$ 0,10, Tabela 6. A faixa de variação encontrada para a penetração do fluconazol no SNC foi expressa através do IC95% que forneceu valores de 0,47-0,87 para a razão LCR/plasma. A alta variabilidade obtida interpacientes pode ser atribuída a maior ou menor gravidade do caso uma vez que na meningite ocorrem alterações da permeabilidade da barreira.

6 – DISCUSSÃO

6.1 Validação do método para determinação de anfotericina B

Reportaram-se métodos em CLAE para determinação de anfotericina B no plasma e LCR (EGGER *et al.*, 2001; ELDEM & ARICAN-CELLAT, 2001), soro (*et al.*, 1984; LOPEZ-GALERA *et al.*, 1995; LAMBROS *et al.*, 1996; ALAK *et al.*, 1996), secreção respiratória (LOPEZ *et al.*, 1998) e tecidos (LAMBROS *et al.* 1996).

Alak e colaboradores, 1996, utilizaram a injeção direta da amostra no sistema cromatográfico; o inconveniente do procedimento é o grande número de componentes endógenos, principalmente proteínas solúveis presentes no extrato que conferem baixa especificidade. Em decorrência disso exige-se a troca freqüente das pré-colunas, redução da vida útil da coluna analítica, entupimento do injetor e de toda a tubulação do sistema cromatográfico com aumento de pressão e vazamentos freqüentes impedindo a operacionalização.

Por outro lado, reportou-se a precipitação de proteínas na purificação da amostra utilizando vários agentes dentre eles o metanol (KIM *et al.*, 1984; LOPEZ-GALERA *et al.*, 1995; LAMBROS *et al.*, 1996); em contrapartida, o método proposto no presente estudo apresenta a vantagem de obtenção de extrato límpido após a centrifugação pela precipitação das proteínas do plasma com acetonitrila na proporção de 1:3, garantindo-se ainda boa especificidade.

Adicionalmente, a purificação da amostra realizada através de extração em fase sólida garante alta especificidade e seletividade, mas é de alto custo quando comparado aos métodos convencionais (EGGER *et al.*, 2001; ELDEM & ARICAN-CELLAT, 2001; LOPEZ *et al.*, 1998). Além disso, para fármacos lipossolúveis como a

anfotericina B a recuperação geralmente fica comprometida pela utilização deste procedimento.

Conforme reportado por Eldem & Arican-Cellat (2001), devido a foto e termossensibilidade desse fármaco, deve-se considerar ainda o problema da estabilidade durante todo o procedimento de análise, e processamento tal como a manipulação e preparação das soluções padrão estoque e intermediárias, padrões de referência em plasma (calibradores e controles internos) e matrizes biológicas dos pacientes, além de armazenamento adequado do material.

No presente estudo, garantiu-se a proteção da radiação para o padrão de referência (anfotericina B cristalina) e para as soluções padrão do fármaco pela manipulação em laboratório climatizado (20° C) com luz amarela; adicionalmente realizou-se o armazenamento do padrão de referência em geladeira e das soluções padrão em congelador (-20°C). A proteção dos calibradores, controles internos e matrizes biológicas dos pacientes foi garantida tanto no preparo das amostras no estudo como durante todo o procedimento de purificação pelo trabalho em laboratório de luz amarela; tais cuidados garantiram a alta recuperação do analito além de ótima estabilidade para a anfotericina B durante os procedimentos.

Relativamente ao sistema cromatográfico e condições de análise, reportou-se alto fluxo para eluição do fármaco, com a desvantagem da redução da vida útil da coluna analítica (ALAK *et al*, 1996; EGGER *et al.*, 2001; ELDEM & ARICAN-CELLAT, 2001; KIM & LIM, 1984; LAMBROS *et al*, 1996; LOPEZ *et al*, 1998; LOPEZ-GALERA *et al*, 1995).

Com referência a linearidade, considerando o intervalo para vale 0,5-2,0 µg/mL, estudos anteriores reportaram duas ou mais faixas de concentração para a anfotericina B no plasma (ALAK *et al.* 1996, EGGER *et al.*, 2001; ELDEM & ARICAN-CELLAT, 2001; KIM & LIM, 1984; LAMBROS *et al*, 1996; LOPEZ *et al*, 1998; LOPEZ-GALERA *et al*, 1995).

Entretanto no presente estudo, a ampla linearidade obtida garantiu trabalho em larga faixa de concentração (0,2-25,0 µg/ml) suficiente e satisfatória para aplicação no monitoramento da eficácia e toxicidade nos pacientes com meningite criptocócica em terapia de alta dose com anfotericina B; considerou-se ainda aquelas situações de acúmulo do fármaco naqueles pacientes evoluindo para insuficiência renal aguda ou na vigência de disfunção crônica moderada a grave.

6.2 Validação do método para determinação de fluconazol

Utilizou-se CLAE-UV em inúmeros métodos reportados para determinação de fluconazol em matrizes biológicas, tais como plasma, soro, saliva e LCR. Reportou-se ainda que tais procedimentos, pela presença do grande número de componentes endógenos, principalmente proteínas solúveis presentes no extrato, tem como consequência a troca freqüente das pré-colunas, redução da vida útil da coluna analítica, além de entupimento da tubulação interna e do injetor automático do sistema cromatográfico gerando aumento de pressão e ainda vazamentos que prejudicam a operacionalização (EGLE *et al.*, 2004; COCIGLIO *et al.*, 1996; INAGAKI *et al.*, 1992; KOKS *et al.*, 1994; NG *et al.*, 1996; WALLACE *et al.*, 1992; WATTANANAT & WIYADA, 2006). O maior problema desses métodos anteriormente reportados está relacionado a baixa seletividade e sensibilidade (COCIGLIO *et al.*, 1996; INAGAKI *et al.*, 1992; KOKS *et al.*, 1994; WALLACE *et al.*, 1992; WATTANANAT & WIYADA, 2006).

Por outro lado a extração líquido-líquido apresenta seletividade superior quando comparada a precipitação de proteínas com metanol ou acetonitrila, e é ainda procedimento de menor custo quando comparado a extração em fase sólida. O método

descrito no presente estudo consiste na determinação de fluconazol em plasma e LCR, destacando-se pela rapidez e baixo custo.

A purificação das amostras através de extração simples líquido-líquido em meio alcalino, é semelhante ao procedimento de Wallace e colaboradores, 1992 pela utilização de diclorometano e superior a extração de Koks e colaboradores, 1994, que utilizou extração líquido-líquido dupla com mistura de clorofórmio e 2-propanol cuja desvantagem reside na obtenção de extrato impuro pela maior polaridade da mistura extratora.

Wattananat & Wiyada, 2006 e Inagaki e colaboradores, 1992, utilizaram procedimento altamente seletivo envolvendo a extração em fase sólida na purificação das matrizes biológicas; entretanto a principal desvantagem é o alto custo do processo.

Quanto às condições cromatográficas, reportou-se para a maioria dos métodos anteriores que utilizaram coluna de fase reversa C18 e fase móvel binária contendo mistura tamponada sob fluxo de 1mL/min (EGLE *et al.*, 2004; COCIGLIO *et al.*, 1996; INAGAKI *et al.*, 1992; KOKS *et al.*, 1994; NG *et al.*, 1996; WALLACE *et al.*, 1992; WATTANANAT & WIYADA, 2006).

O sistema cromatográfico descrito no presente estudo tem a vantagem de utilizar a água UP em substituição ao tampão reportado anteriormente além de baixo fluxo de operação. Um sistema semelhante foi reportado por Cociglio e colaboradores, 1996; entretanto registrou-se baixa especificidade comprometendo a seletividade uma vez que as matrizes biológicas foram injetadas diretamente no sistema cromatográfico.

Em conformidade com trabalhos anteriores, optou-se pelo comprimento de onda de 210 nm que apresenta boa sensibilidade para o fluconazol (EGLE *et al.*, 2004; COCIGLIO *et al.*, 1996; INAGAKI *et al.*, 1992; KOKS *et al.*, 1994; NG *et al.*, 1996; WALLACE *et al.*, 1992; WATTANANAT & WIYADA, 2006). Por outro lado, uma série de interferentes são detectados já que muitas substâncias não-específicas mostram considerável absorbância nesse comprimento de onda. Uma outra opção seria utilizar

medida em 260 nm, entretanto ocorre considerável perda da sensibilidade na detecção do fármaco relativamente a 210 nm. Apesar disso, optou-se pelo comprimento de onda de 210 nm para a determinação de fluconazol em matrizes biológicas uma vez que a extração líquido-líquido garantiu a purificação adequada e eliminação dos interferentes.

Relativamente a linearidade, estudos anteriores referem diversas faixas de trabalho 0,1-0,2, 0,2-10,0 e 12,5-20 e 20-25 µg/mL para monitoramento desse antifúngico (EGLE *et al.*, 2004; COCIGLIO *et al.*, 1996; INAGAKI *et al.*, 1992; WALLACE *et al.*, 1992; WATTANANAT & WIYADA, 2006).

No presente estudo reportou-se larga faixa de trabalho (0,2-250 µg/mL) superior aquela descrita por Koks e colaboradores, 1994 em pacientes portadores de HIV com infecção fúngica. Considera-se essencial a utilização de método com ampla faixa de linearidade uma vez que concentrações de até 100 µg/mL podem ser encontradas ao término da infusão nos pacientes portadores de meningite criptocócica em terapia de alta dose com o fluconazol (COUSIN *et al.*, 2003). Uma vez que a transferência do fluconazol para o LCR é alta, esta linearidade é satisfatória para a análise do fármaco em líquido. Além disso, os estudos de estabilidade e robustez foram incluídos neste trabalho para enriquecimento da validação, diferentemente dos métodos anteriormente reportados.

6.3 Monitoramento Terapêutico

6.3.1 Penetração da anfotericina B no SNC nos pacientes com meningite criptocócica

A anfotericina B pela administração sob a forma coloidal evidencia meia-vida biológica de 18 horas, volume aparente de 0,76 L/kg e depuração plasmática de 0,46 mL/min.kg; considera-se ainda que a ligação as proteínas plasmáticas seja de relevância e bastante alta (>90%) o que justifica em parte a dificuldade de penetração do fármaco no SNC, uma vez que frações da dose administrada inferiores a 4% são descritas no LCR (CATALÁN & MONTEJO, 2006; DUPONT, 2002).

A absorção através do trato gastrointestinal é pobre e portanto, recomenda-se que a administração seja realizada através de infusão intravenosa por período de 4 horas devido aos efeitos adversos graves relacionados a velocidade de infusão. A anfotericina B é pouco metabolizada, menos de 15% do fármaco é metabolizado no fígado e apenas 2-5% (FeI) são eliminados através da urina e bile sob a forma inalterada (CATALÁN & MONTEJO, 2006). Embora Bekersky e colaboradores (2002) em estudo clínico de fase IV relatem que essa fração possa chegar a 20% na urina e a 43% nas fezes, adicionalmente, sugere-se que a anfotericina B na forma de deoxicolato não seja metabolizada em humanos, o que explicaria a alta nefro toxicidade deste fármaco.

A prescrição da anfotericina B é limitada pela sua toxicidade renal com incidência em 50% dos casos de pacientes em terapia de alta dose (1,0mg/kg), se manifestando a partir de concentrações plasmáticas acima de 3 µg/mL (DUPONT, 2002). Embora a meia-vida biológica seja da ordem de 18 horas e a administração seja intravascular uma vez ao dia, estudo recente realizado com pacientes submetidos a terapia crônica sugere que o modelo tricompartimental seja o mais adequado com base

na meia-vida da fase gama da ordem de 15 dias. Tal fato justificaria a fixação da anfotericina B nos tecidos na proporção: fígado> baço> rins> pulmão> miocárdio> cérebro, através de resultados obtidos da necropsia de pacientes recebendo anfotericina B e que evoluíram a óbito pela infecção fúngica e sepse (VOGELSINGER et al., 2006).

Segundo Vogelsinger e colaboradores, 2006, a fixação da anfotericina B é baixa no cérebro quer pela administração da medicação sob a forma de dispersão coloidal ou sob a forma lipossomal, justificando-se a pobre penetração desse fármaco no SNC pela utilização das duas formulações.

Os pacientes com meningite criptocócica apresentam alteração da permeabilidade da barreira o que poderia contribuir para o aumento da penetração do antifúngico no SNC (CATALÁN & MONTEJO, 2006). Entretanto larga dispersão nos resultados foi obtida no presente estudo para a razão LCR/plasma; desta forma sugere-se a existência de diferença não apenas entre os pacientes mas também o estágio da doença em cada paciente investigado.

6.3.2 Penetração do fluconazol no SNC nos pacientes com meningite criptocócica

Relativamente a farmacocinética, o fluconazol apresenta meia-vida biológica de 32+/-5 horas, volume aparente de distribuição de 0,6 L/kg e depuração plasmática de 0,27+/-0,07 mL/min.kg; além disso a biodisponibilidade oral é alta, a ligação as proteínas do plasma é desprezível (11%) e a excreção urinária do produto inalterado é relevante (Fel: 75%), prevendo-s redução na dose de manutenção para os pacientes com disfunção renal (DEBRUYENE & RYCKELYNCK, 1993; HENDERSON & CHAPMAN, 2003). Cousin, e colaboradores, 2003 em estudo de revisão recomendam o ajuste da dose de manutenção para o fluconazol em pacientes com disfunção renal severa uma vez que a

farmacocinética se encontra bastante alterada pela redução da depuração plasmática e prolongamento da meia-vida biológica.

Na profilaxia das recidivas da meningite por *Cryptococcus neoformans* nos pacientes com AIDS, recomendam-se doses de 200mg de fluconazol ao dia por período indefinido com manutenção das concentrações ao redor de 7-8 µg/ml (NIGHTINGALE *et al.*, 1992). Grande variabilidade nas doses utilizadas é reportada na literatura empregando o fluconazol sob a forma de cápsulas devido a alta biodisponibilidade ou então a infusão intravenosa, dependendo da fase do tratamento e da gravidade da doença. Adicionalmente deve se considerar ainda na dose de fluconazol planejada para o tratamento da meningite criptocócica se o paciente tem associada ou não a doença de AIDS (GALLAGHER *et al.*, 2004; TUCKER *et al.*, 1988).

Reportou-se tratamento com fluconazol, na meningite criptocócica de pacientes não imunossuprimidos, dose de ataque PO, 100mg seguido de manutenção de 50mg ao dia durante 2 semanas. Após esse período, a dose foi aumentada para 100mg ao dia PO ou infusão intravenosa com base na tolerância do paciente; reportaram-se concentrações sangüíneas de 2,5-3,5 µg/ml (50mg/d) e 4,5 a 8,0 µg/ml para doses de 100mg/dia (GALLAGHER *et al.*, 2004; TUCKER *et al.*, 1988).

Foulds e colaboradores, 1988, investigaram a penetração do fluconazol em voluntários sadios através de infusão intravenosa na dose de 50 mg ao dia durante 1 semana obtendo-se concentrações no LCR e plasma respectivamente de 2,1 e 2,6 µg/ml no vale, e de 5,2 e 6,5 µg/ml no pico; além disso os autores reportaram que a penetração de fluconazol é alta e da ordem de 50% após dose de 50 mg ao dia aumentando para 62% (dose diária de 100mg) uma vez que vales de 2,7 µg/ml (LCR) e de 4,3 µg/ml (plasma) foram registrados. Esses mesmos autores reportaram ainda penetração aumentada para o fluconazol (0,75-0,93) nos 3/4 pacientes com meningite criptocócica e

em 1/4 paciente com abscesso cerebral e infecção disseminada por *Pseudallescheria* (FOULDS et al., 1988).

Quando se administraram doses de 800 mg diários a pacientes portadores da doença, a concentração de fluconazol aumentou para 49 +/- 14 µg/mL no plasma e 40 +/- 14 µg/mL no LCR (HAUBRICH et al., 1996), e para 42 +/- 26 µg/mL no plasma e 36 +/- 21 µg/mL no LCR (MENECHETTI et al., 1996); em ambos, a razão LCR/plasma foi de 0,82 e 0,86, respectivamente.

Nos casos de meningite criptocócica e infecções por *Cryptococcus neoformans* em outros locais, a dose usual é de 400mg no primeiro dia seguido de 200-400 mg ao dia na manutenção. A duração do tratamento das infecções criptocócicas dependerá da resposta clínica e micológica, porém para a meningite criptocócica esse período é de no mínimo 6-8 semanas. Por outro lado, a literatura é controversa quanto ao MIC para o *Cryptococcus neoformans*. Fernandez e colaboradores, 1999, reportaram que o MIC para o agente é de 16mg/L semelhante ao da *Candida glabrata*, enquanto que para a *Candida albicans* esse parâmetro é de 1mg/L (MORERA et al., 2002; SAFDAR et al., 2002). Entretanto em trabalho anterior (dados não publicados, PFIZER) o MIC para o *Cryptococcus neoformans* variou entre 0,4 – 6,3 quando se utilizou o fluconazol. Como no tratamento de infecções severas de SNC, fase crítica da doença, procura-se manter as concentrações para o fluconazol circulante da ordem de 4 vezes o MIC, após dose de 400mg duas vezes ao dia espera-se atingir altas concentrações para o fluconazol circulante (LEDINGHAM & WARRELL, 2000; PAPPALARDO, 2002; PFALLER *et al.*, 2005).

No presente estudo, a terapia de alta dose empregando o fluconazol através de administração intravascular por infusão rápida (400mg, 2 vezes ao dia) sugere que concentrações de 40 a 100 µg/mL sejam alcançadas no pico plasmático caindo para 11 e 30 µg/mL imediatamente antes da dose subsequente.

A razão LCR:plasma expressa a medida da transferência do fluconazol do plasma para os tecidos, e mais especificamente a penetração do fármaco no SNC, dissolvendo-se muito bem no LCR. Em diferentes estudos relataram-se razões LCR:plasma de 0,52 para voluntários sadios e da ordem de 0,8 a 0,9 para pacientes com meningite criptocócica (FOULDS et al., 1988; GALLAGHER et al., 2004; MENICHETTI et al., 1996). Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam valores entre 0,2 e 0,8 para a razão LCR : plasma; tal variação se deve provavelmente a condição individual de cada paciente frente ao tratamento com o antifúngico ou em função de diferente estágio da doença nos pacientes investigados. Por outro lado, a concentração plasmática média equivalente a 31,7 µg/mL para o vale e IC95% de 20,1-43,3 µg/mL sugere que parte dos pacientes investigados no presente estudo mostrem níveis circulantes adequados para o fluconazol na fase crítica da doença, garantindo-se sua transferência para o SNC, local da infecção fúngica. Entretanto deve-se considerar ainda que o monitoramento terapêutico seja custo efetivo nestes casos para farmacoterapia dose ajustada como fluconazol.

7 – CONCLUSÕES

- Os métodos bioanalíticos validados mostraram boa seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão consideradas adequadas para a determinação de fluconazol e anfotericina B em plasma e líquido de pacientes com meningite criptocócica e AIDS.
- As concentrações dos antifúngicos no plasma e no LCR forneceram as razões que permitiram estimar a penetração dos antifúngicos no SNC, sendo considerada pobre para a anfotericina B e ótima para o fluconazol.

- O monitoramento terapêutico desses antifúngicos é custo efetivo, uma vez que os efeitos adversos podem ser minimizados e a eficácia maximizada pela terapia de alta dose nos pacientes com meningite criptocócica e AIDS.
- Finalmente, com base na alta penetração do fluconazol no SNC e baixa penetração da anfotericina B, sugere-se que esta associação seja substituída pela monoterapia com o fluconazol que proporciona eficácia comprovada e melhoria da segurança terapêutica.
- De forma a garantir o controle da meningite criptocócica, sugere-se que o atual tratamento instituído pela associação de antifúngicos seja revisto.

8 – REFERÊNCIAS

ALAK, A.; MOY, S.; BEKERSKY, I. A high-performance liquid chromatographic assay for the determination of amphotericin B serum concentrations after the administration of ambisome, a liposomal amphotericin B formulation. *Ther Drug Monit.* v.18, p.604-9, 1996.

BAGINSKI, M.; STERNAL, K.; CZUB, J.; BOROWSKI, E. Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, apolyene macrolide antifungal antibiotic. *Acta Biochimica Polonica.* v.52, n.3, p.655-58, 2005.

BAILLY, M. P.; BOIBIEUX, A.; BIRON, F.; DURIEU, I.; PIENS, M. A.; PEURAMOND, D.; BERTRAND, J. L. Persistence of *Cryptococcus neoformans* in the prostate: failure of fluconazole despite high doses. *J Infect Dis.* v.164, p.435-6, 1991.

BARRETO DE OLIVEIRA, M. T.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; HAGEN, F.; BARONI, F. A.; LAZERA, M. S.; LENGELER, K. B.; HEITMAN, J.; RIVERA, I. N. G.; PAULA, C. R. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *Journal of clinical microbiology.* v.42, n.3, p.1356-1359, 2004

BENSON, J. M.; NAHATA, M. C. Pharmacokinetics of Amphotericin B in children. *Antimicrob Ag Chemotherapy.* v.33, n.11, p.1989-93, 1989.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 03 de junho de 2004. *Diário oficial da União*, 04 de junho de 2003.

BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr B Biomed Appl.* v.686, n.1, p.3-10, 1996.

BROUWER, A. E.; RAJANUWONG, A.; CHIERAKUL, W.; GRIFFIN, G. E.; LARSEN, R. A.; WHITE, N. J.; HARRISON, T. S. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. *The lancet.* v.363, p.1764-1767, 2004.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Ver Esp Quimioterap.* v.19, n.2, p.130-9, 2006.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*, Washington, ASM Press, p.541, 1998.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Systemic antifungals. Pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Ver Iberoam Micol.* v.23, n.1, p.39-49, 2006.

CHEN, L. C.; BLAN, E. S.; CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Diag Lab Immunol.* v.3, p.570 – 4, 1996.

CHUCK, S. L.; SANDE, M. A. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Eng J Med.* v.321, p.794-9, 1989.

COCIGLIO, M.; BRANDISSOU, S.; ALRIC, R.; BRESSOLLE, F. High-performance liquid chromatographic determination of fluconazole in plasma. *J Chromatog Biomed Applications*. v.686, p.11-17, 1996.

COUSIN, L.; BERRE, M.; LAUNAY-VACHER, V.; IZZEDINE, H.; DERAY, G. Dosing guidelines for fluconazole in patients with renal failure. *Nephrol Dial Trans*. v.18, n.11, p.2227-31, 2003.

CROWE, S. M.; CARLIN, J. B.; STEWART, K.I.; LUCAS, C. R.; HOY, J. F. Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons. *J Acquir Immune Defic Syndr*. v.4, p.770-6, 1991.

DISMUKES, W. E. Cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *J Infect Dis*. v.317, p.334-41, 1988.

DRUTZ, D. J. Rapid infusion of amphotericin B: is it safe, effective and wise? *Am J Med*. v.93, p.19-21, 1992.

DEBRUYENE, D.; RYCKELYNCK, J. P. Clinical Pharmacokinetics of fluconazole. *Clin Pharmacokinet*. v.24, n.1, p.10-27, 1993.

EGGER, P.; BELLMANN, R.; WIEDERMANN, C. J. Determination of amphotericin B, liposomal amphotericin B, and amphotericin B colloidal dispersion in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatog B*. v.760, p.307-13. 2001.

EGLE, H.; TRITTLER, R.; KÜMMERER, K. A new, rapid, fully automated method for determination of fluconazole in serum by column-switching liquid chromatography. *Ther Drug Monit.* v.26, n.4, p.425-31, 2004.

ELDEM, T.; ARICAN-CELLAT, N. Determination of amphotericin B in human plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* v.25, p.53-64, 2001.

FERNANDES, O. F. L.; COSTA, T. R.; COSTA, M. R.; SOARES, A. J.; PEREIRA, A. J. S. C.; SILVA, M.; ROSARIO, R. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. *Ver Soc Bras Med Trop.* v.33, n.1, 2000.

FERNANDEZ, A. C. M.; PIMENTEL, T. T.; MARTINEZ, M. G.; GONZALEZ, M. M. Determination of the minimum inhibitory concentration of fluconazole against *Cryptococcus neoformans*. *Ver Cubana Med Trop.* v.51, p.55-57, 1999.

FOULDS, G.; BRENNAN, D. R.; WAJSZCZUK, C.; CATTANZAARO, ^a; GAARG, D. C.; KNOPF, W.; RINALDI, M.; WEIDLER, D. J. Fluconazole penetration into cerebrospinal fluid in humans. *J Clin Pharmacol.* v.28, p.363-6, 1988.

GALLAGHER, J. C.; LEE, K. B. Program to restrict use of i.v. fluconazole. *Am J H-Syst Phar.* v.61, n.16, p.1695-1698, 2004.

GEORGOPAPADAKOU, N. H.; WALSH, T. J. Antifungal Agents: chemotherapeutics targets and immunologic strategies. *Antimicrob Ag Chemotherapy*. v.40, n.2, p.279-291, 1996

GROLL, A. H.; WALSH, T. J. Antifungal chemotherapy: advances and perspectives. *Swiss Med WKLY*. v.132, p.303-311, 2002.

HADDAD, N. E.; POWDERLY, W. G. The changing face of mycoses in patients with HIV/AIDS. *AIDS Reader*. v.11, p.365-78, 2001.

HARRISON, T. S. *Cryptococcus neoformans* and cryptococcosis. *Journal of Infection*. v.41, p.12-17, 2000.

HAUBRICH, K. H.; HAGHIGHAT, D.; BOZZETTE, S. A.; TILLES, J.; MACCUTCHAN, J. A. High-dose fluconazole for treatment of cryptococcal disease in patients with human immunodeficiency virus infection. The California collaborative treatment group. *Clin Infect Dis*. v.22, n.5, p.838-40, 1996.

HENDERSON, H. M.; CHAPMAN, S.W. Infections due to Fungi, Actinomyces and Nocardia. in: BETTS, R. F.; CHAPMAN, S. W.; PENN, R. L., eds. *Reese and Betts' a pratical Approach to Infectious Diseases*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.628-630, 2003.

IMWIDTHAYA, P.; POUNGVARIN, N. Cryptococcosis in AIDS. *Postgrad Med J*. v.76, p.85-88, 2000.

INAGAKI, K.; TAKAGI, J.; LOR, E.; OKAMOTO, M. P.; GILL, M. A. Determination of fluconazole in human serum by solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit.* v.14, p.306-11, 1992.

JACOBSON, E. S.; TINELL, S. B. Antioxidant function of fungal melanin. *J Bacteriol.* v.175, p.7102-4, 1993.

KHANNA, N.; CHANDRAMUKI, A.; DESAI, A.; RAVI, V. Cryptococcal infection of the central nervous system : an analysis of predisposing factors, laboratory findings and

outcome in patients from South India with special reference to HIV infection. *J Med Microbiol.* v.45, p.376-9, 1996.

KIM, H.; LIN, C. High-pressure liquid chromatographic method for determination of Sch 2819 in biological fluids. *Antimicrob Ag Chemotherapy.* v.25, n.1, p.45-48, 1984.

KOKS, C. H. W.; ROSING, H.; MEENHORST, P. L.; BULT, A.; BEIJNEN, J. H. High-performance liquid chromatographic determination of the antifungal drug fluconazole in plasma and saliva of human immunodeficiency virus-infected patients. *J Chromatog Biomed Applications.* v.663, p.435-51, 1994.

KOVACS, J. A.; KOVACS, A. A.; POLIS, M.; WRIGHT, W. C.; GILL, V. J.; TUAZON, C. U.; GELMANN, E. P.; LANE, H. C.; LONGFIELD, R.; OVERTURF, G; *et al.* Cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med.* v.103, p.533-8, 1985.

KWON-CHUNG, K. J. Cryptococcosis. In: *Medical mycology*. Eds, Kwon-Chung, K. J. and Bennett, J. E. Philadelphia: Lea & Febiger, pp 397-466, 1992.

LA ROCCO, M. *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Newsletter*. v.14, p.177-81, 1992.

LAMBROS, M. P.; ABBAS, S. A.; BOURNE, D. W. A. New high-performance liquid chromatographic method for amphotericin B analysis using an internal standard. *J Chromatog B*. v.685, p.135-40, 1996.

LARSEN, R. A.; BAUER, M.; BROUWER, A. E.; SANCHEZ, A.; THOMAS, A. M.; RAJANUWONG, A.; CHIERAKUL, W.; PEACOCK, S. J.; DAY, N.; WHITE, N. J.; RINALDI, M. G.; HARRISON, T. S. In vitro-clinical correlations for amphotericin B susceptibility in AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Antimicrob Ag Chemotherapy*. v.51, n.1, p.343-345, 2007.

LARSEN, R. A.; BOZZETTE, A. S.; MCCUTCHAN A.; CHIU, J.; LEAL, M. A., TILLES, J. G., RICHMAN, D. D. Persistent *Cryptococcus neoformans* infection of the prostate after successful treatment of meningitis. *Ann Intern Med*. v.111, p.125-8, 1989.

LARSEN, R. A.; MADELINE, B.; THOMAS, A. M.; GRAYBILL, J. R. *Antimicrob Ag Chemotherapy*. v.45, n.3, p.985-991, 2004.

LEDINGHAM, J. G. G.; WARRELL, D. A. Concise Oxford Textbook of Medicine, Oxford University Press, p.1727, 2000.

LIZARAZO, J.; LINARES, M.; BEDOUT, C.; RESTREPO, A.; AGUDELO, C. I.; CASTAÑEDA, E. Estudio clínico y epidemiológico de la criptococosis en Colombia: resultados de nueve años de la encuesta nacional, 1997-2005. *Biomédica*. v.27, p.94-109, 2007.

LOPEZ, R.; POU, L.; ANDRES, I.; MONFORTE, V.; ROMAN, A.; PASCUAL, C. Amphotericin B determination in respiratory secretions by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatog A*. v.812, p.135-39, 1998.

LOPEZ-GALERA, R.; POU-CLAVE, L.; PASCUAL-MOSTAZA, C. Determination of amphotericin B in human serum by liquid chromatography. *J Chromatog B*. v.674, p.298-300, 1995.

MANFREDI, R.; CALZA, L.; CHIODO, F. AIDS-associated cryptococcus infection before and after the highly active antiretroviral therapy era: emerging management problems. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v.22, p.449-452, 2003.

MENICHETTI, F.; FIORIO, M.; TOSTI, A.; GATTI, G.; BRUNA PASTICCI, M.; MILETICH, F.; MARRONI, M.; BASSETTI, D.; PAULUZZI, S. High-dose fluconazole therapy for cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis*. v. 22, n.5, p.838-40, 1996.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev*. v.8, p.515-48, 1995.

MORERA, Y.; TORRES-RODRIGUES, J. M.; CAATALAN, I.; GRANADERO, A.; JOSIC, Z.; ALVAAREZ-LERMA, F. Candiduria in patients with urethral catheter admitted in intensive care unit. Etiology and *in vitro* susceptibility to fluconazole. *Med Clin.* v.118, p.580-582, 2002.

NG, T. K. C.; CHAN, R. C. Y.; ADEYEMI-DORO, F. A. B.; CHEUNG, S. W.; CHENG, A. F. B. Rapid high performance liquid chromatographic assay for antifungal agents in human sera. *J Antim Chemot.* v.37, p.465-72, 1996.

NIGHTINGALE, S. D.; CAL, S.X.; PETERSON, D.M; LOSS, S. D.; GAMBLE, B. A.; WATSON, D. A.; MANZONE, C. P.; BAKER, J. E.; JOCKUSCH, J. D. Primary prophylaxis with fluconazole against systemic fungal infections in HIV-positive patients. *AIDS.* v.6, p.191-4, 1992.

OGA, S.; BASILE, A. C.; & CARVALHO, M. F. Guia Zanini-Oga de Interações Medicamentosas. 1ed., São Paulo: Atheneu, 2002 440p.

PAPPALARDO, M. C. S. M. Criptococose em Aids: estudo clínico e microbiológico em 35 pacientes acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, entre 1995 a 1997. São Paulo, Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Infecções e Saúde Pública da Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, 2002.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Ver. Inst. Med. trop. S. Paulo.* v.45, n.6, p.299-305, 2003.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R. J.; DOERN, G. V.; DIEKEMA, D. J. Global Trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990-2004). *Journal of Clinical Microbiology*. v.43, n.5, p2163-2167, 2005.

PEREZ-RAMIREZ, L. P.; BERTRAND, D.; MELHEM, M. S. C.; GIUDICE, M. C.; PIRES, M. F. C.; OROZCO, S. F. B.; CAMPOS, E. P.; AYROSA-GALVÃO, P. LEHMANN, M.

Cryptococcosis in HIV-1 infection : clinical, laboratory and epidemiological study, Montreal, Canadá, Abstract Book of The XI Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, p 99, 1991.

POWDERLY, W. G. Cryptococcal meningitis and AIDS. *Clin Inf Dis*. v.17, p.837-42, 1993.

POWDERLY, W. G.; SAAG, M. S.; CLOUD G. A.; ROBINSON, P.; MEYER, R. D.; JACOBSON, J. M.; GRAYBILL, J. R.; SUGAR, A.M.; MCAULIFFE, V. J.; FOLANSBEE, S. E. A controlled trial of fluconazole or amphotericin B to prevent relapse of cryptococcal meningitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Eng J Med*. v.326, p.793-8, 1992.

RHODES, J. C.; POLLACHEK, I.; KWON-CHUNG, K. J. Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect.Immun.* v.36, p.1175-84, 1982.

RISOVIC, V.; BOYD, M.; CHOO, E.; WASAN, K. M. Effects of lipid-based oral formulations on plasma and tissue amphotericin B concentrations and renal toxicity in male rats. *Antimicrob Ag Chemotherapy*. v.47, p.3339-42, 2003.

SAAG, M. S.; GRAYBILL, R. J.; LARSEN, R. A.; PAPAS, P. G.; PERFECT, J. R.; POWDERLY, W. G.; SOBEL, J. D.; DISMUKES, W. E. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Clin Infect Dis*. v.30, p.710-8, 2000.

SAAG, M. S.; POWDERLY, W. G.; CLOUD, G. A.; ROBINSON, P.; GRIECO, M. H.; SHARKEY, P. K.; THOMPSON, S. E.; SUGAR, A. M.; TUAZON, C. U.; FISHER, J. F.; *et al.* Comparison of amphotericin B with fluconazole in the treatment of acute AIDS-associated cryptococcal meningitis. The NIAID Mycoses Study Group and the AIDS Clinical Trials Group. *N Eng J Med*. v.326, p.83-9, 1992.

SAFDAR, A.; CHATURVEDI, V.; KOLL, B. S.; LARONE, D. H.; PERLIN, D. S.; ARMSTRONG, D. Prospective, multicenter surveillance study of *Candida glabrata*: fluconazole and itraconazole susceptibility profiles in bloodstream, invasive, and colonizing strains and differences between isolates from three urban teaching hospitals in New-York city (Candida susceptibility trends study, 1998 to 1999). *Antimicrob ag chemother*. v.46, p.3268-72, 2002.

TUCKER, R.; WILLIAMS, P. L.; ARAATHOON, E. G.; LEVINE, B. E.; HAARTSTEIN, A. I.; HANSON, L. H.; STTEVENS, D. A. Pharmacokinetics of fluconazole in cerebrospinal fluid and serum in human coccidioidal meningitis. *Antimicrob Ag Chemotherapy*. v. 32, n.3, p.369-73, 1988.

VANDEPITTE, J. Clinical aspects of cryptococcosis in patients with AIDS. in: VANDEN BOSSCHE, H.; *et al. Mycoses in AIDS patients*. Plenum Press, New York, p.115-122, 1990.

VIDOTTO, V.; LEONE, R.; SINICCO, A.; ITO-KUWA, S.; CRISEO, G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bird droppings. *Mycopathol.* v.142, p.71-6, 1998.

VIDOTTO, V.; MELHEM, M. S. C.; PUKINSKAS, S. ; AOKI, S.; CARRARA, C.; PUGLIESE, C. Extracellular enzymatic activities in *Cryptococcus neoformans* AIDS Brazilian strains. *Rev Ibero Americana.* v.17, n.148, p.2-6, 2000.

VOGELSINGER, H.; WEILER, S.; DJANANI, A.; KOUNTCHEV, J. BELLMANNWEILER, R.; WIEDERMANN, C. J., BELLMANN, R. *Antimicrob Ag Chemotherapy.* v.57, p.1153-60, 2006.

WALLACE, J. E.; HARRIS, S. C.; GALLEGOS, J.; FOULDS, G.; CHEN, T. J.; RINALDI, M. G. Assay of fluconazole by high-performance liquid chromatography with a mixed-phase column. *Antimicrob Ag Chemotherapy.* v.36, n.3, p.603-6, 1992.

WALSH, T. J.; PIZZO, A. Treatment of systemic fungal infections : recent progress and current problems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* v.7, p.460 –75, 1988.

WATTANANAT, T.; WIYADA, A. Validated HPLC method for the determination of fluconazole in human plasma. *Biomed. Chromatog.* v.20, p.1-3, 2006.

WILKS, D. Neurological complications of HIV. *Medicine*. v.33, n.6, p.22-23, 2005.

ZUGER, A.; LOUIE, E; HOLZMAN, R. S., SIMBERKOFF, M. S.; RAHAL, J. J. Cryptococcal disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome : diagnostic features and outcome of treatment. *Ann Intern Med*. v.104, p.234–40, 1986.