

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

MICHEL SILVEIRA BRAGATTO

Monitoramento terapêutico de fluconazol com suporte farmacocinético
em pacientes grandes queimados com internação prolongada para
controle das infecções fúngicas.

São Paulo

2011

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

MICHEL SILVEIRA BRAGATTO

Monitoramento terapêutico de fluconazol com suporte farmacocinético em pacientes grandes queimados com internação prolongada para controle das infecções fúngicas.

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Silvia Regina C. J. Santos

São Paulo
2011

MICHEL SILVEIRA BRAGATTO

Monitoramento terapêutico de fluconazol com suporte farmacocinético em pacientes grandes queimados com internação prolongada para controle das infecções fúngicas.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Silvia Regina Cavani Jorge Santos
Orientador/presidente

1° Examinador

2° Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2011.

DEDICATÓRIA

A Rebeca, pelo incentivo e força nos momentos difíceis,
pela paciência, compreensão, carinho,
sempre acreditando e me motivando nesta caminhada.

Minha amada...

Aos meus pais, Fernando e Aparecida e minha irmã, Fernanda,
por todo o apoio, amor, mesmo que distantes
sempre presentes em meu coração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas graças concedidas.

À Professora Silvia Regina Cavani Jorge Santos,
por acreditar e tornar possível a realização deste sonho,
pelos ensinamentos, hospitalidade e conselhos que levarei pela vida
e por ser um exemplo de constante amor e
dedicação à vida acadêmica e familiar.
A você minha reverência.

Ao apoio das Empresas Prati-Donaduzzi e
Biocinese para realização deste
projeto de qualificação profissional.

Aos amigos do laboratório (Adriana, Carlindo, Edgar)
pelos momentos inesquecíveis que compartilhamos.

Em especial minha grande amiga Cristina,
pelo companheirismo, conversas
e conselhos compartilhados.

Aos pacientes que aceitaram participar deste projeto acadêmico.
Espero que de alguma forma, tenhamos contribuído para
a melhora da farmacoterapia em queimados.

À Pós-graduação da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas pela oportunidade de realizar o
Mestrado, em especial a Beth, Jorge e Elaine.

Aos amigos queridos que torceram por mim
durante a realização deste trabalho

*“Não é o cérebro o que mais importa, mas sim
o que o orienta: o caráter, o coração, a
generosidade, as idéias”*

Fiodor Dostoievski

RESUMO

A sepse é a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes queimados, uma vez que profundas alterações ocorrem na farmacocinética de agentes anti-infecciosos prescritos para o controle das infecções. Além disso, pacientes queimados podem apresentar quadro de infecção por germes da comunidade, numa fase precoce de internação na UTI, devendo receber antimicrobianos que diferem daqueles indicados na infecção sistêmica causada por germes hospitalares. Adicionalmente, na vigência de infecção fúngica, o quadro se torna ainda mais grave para os pacientes queimados de prolongada internação e imunocomprometimento. No presente trabalho deve como objetivo realizar o monitoramento plasmático de fluconazol prescrito aos pacientes com infecção sistêmica fúngica internados na UTI e investigar a farmacocinética para o ajuste do regime de dose no controle da infecção fúngica nos pacientes queimados. Investigaram-se 12 pacientes queimados internados na UTI/ Unidade de Queimados - Divisão de Cirurgia Plástica do HC FMUSP, portadores de infecção fúngica recebendo fluconazol através de infusão. Os pacientes receberam o antifúngico geralmente em associação a outros antimicrobianos para o controle das infecções seguindo a recomendação da CCIH do hospital relativa ao regime de dose empírica inicial do controle de infecção na UTI de Queimados. Realizou-se o monitoramento plasmático do fluconazol através da coleta de amostras sanguíneas de pico e vale. Complementarmente, a critério Clínico, foram colhidas amostras seriadas de sangue (pico, 1ª, 2ª, 4ª, 6ª e vale), totalizando seis coletas, para investigação da farmacocinética do agente que requereu ajuste de dose e individualização de terapia no paciente queimado. As coletas de sangue foram realizadas através de cateter venoso (2 mL/coleta em tubos contendo EDTA sódico) pelo médico intensivista de plantão na UTI; o plasma foi obtido pela centrifugação para análise do fármaco de interesse ou então armazenado no congelador (-80° C) até o ensaio. Previamente à realização da Etapa Clínica, foi realizado no Laboratório a validação do método bioanalítico para quantificação do fluconazol no plasma com base na legislação nacional e boas práticas de laboratório, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector ultravioleta. A estatística foi realizada pelo tratamento estatístico com utilização do *software GraphPad InStat 4.0.*, *GraphPad Prism 4.0.*, pela utilização de testes não paramétricos. A modelagem farmacocinética foi realizada através da aplicação do *software NonCompartmental Analysis, PK Solutions 2.0.*, aos pares de dados (C vs T) para o agente antifúngico investigado. Os pacientes queimados incluídos no protocolo eram adultos de ambos os sexos 8M/4F, 46,8 ± 20,6 anos, 69,9 ± 11,5 kg, 38,8 ± 24,0% de superfície corporal queimada, e os agentes da queimadura foram para 10 pacientes/ térmico-fogo e para dois pacientes/trauma elétrico; a lesão inalatória foi registrada em 50% pacientes com queimadura pelo fogo. Foram realizados 31 seguimentos farmacoterapêuticos com a emissão de laudos de resultado de exame para o fluconazol. Registrou-se alta variabilidade na farmacocinética para todos os parâmetros investigados. Adicionalmente, registrou-se alteração significativa na farmacocinética do fluconazol nos diversos seguimentos realizados nos pacientes queimados com disfunção renal dialítica quando comparados aqueles em que se registrou função renal preservada. O método bioanalítico mostrou-se adequado ao monitoramento das concentrações plasmáticas do fluconazol através cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV. Registrou-se alta variabilidade na farmacocinética desse agente que justificou em parte a substituição da terapia empírica inicial pela dose ajustada para garantia de terapia eficaz ao paciente queimado.

Palavras-chave: queimados, infecção fúngica, monitoramento plasmático, modelagem farmacocinética, CLAE-UV.

ABSTRACT

The sepsis is a main cause of morbidity and mortality in burn patients, once pharmacokinetics of anti-infective drugs prescribed for the control of systemic infections are significantly altered in those patients. In addition, burn patients in the ICU, initially can present infections by community microbial and must receive different antimicrobials than those prescribed for sepsis. On the other hand, burn immunocompromized patients with prolonged staying in the ICU, re-incidence of sepsis and fungal infection requires an effective antifungal agent that must be associated to the antimicrobials prescription. The objective of the study was to therapeutic plasma monitoring of fluconazole largely prescribed to burn patients from the ICU with fungal infection, Pharmacokinetic modeling for dose adjustment and for the control of infection. Twelve burn inpatients with systemic fungal infections from the ICU Burns- Division of Plastic Surgery of Clinics Hospital Medical School University of Sao Paulo received systemically antimicrobials/ antifungal agents. In general burn patients received several antimicrobial agents as recommended by the Control of Hospital Infection Committee as empirical dose at the beginning of therapy and also afterwards in the ICU. The control of infections by community microbial or yet by hospital microbial, and also for fungal infection, was performed by drug plasma after blood sample collection at the peak and at the trough. Complementary, usually by clinical criteria, six blood sample collections were performed at time dose interval (end of drug infusion 1st, 2nd, 4th, 6th and at the trough) for pharmacokinetic purposes, dose adjustment and individualization of drug therapy for burn patients. Blood sample collection was done by the physician from the ICU by venous catheter (2mL/each into blood collection tubes sodium EDTA); plasma obtained by centrifugation of blood tubes were analyzed in the same day or in a deep freezer to storage (-80° C) until assay. Bioanalytical method reported previously was re-validated as recommended by good laboratory practices (GLP). Parameters as linearity, sensitivity, precision and accuracy, recovery and stability, specificity and selectivity were determined for all drugs investigated to guaranteed drug plasma measurements during the pharmacotherapeutic follow up in the ICU. Descriptive statistics was performed by applying the software GraphPad InStat 4.0., GraphPad Prism 4.0 non parametric tests. Pharmacokinetics was estimated by applying the software NonCompartmental Analysis, PK Solutions 2.0, to data (C vs T) for each antimicrobial agent. Burn patients included in the protocol were of both genders 8M/4F, 46.8+/- 20.6 yrs, 69.9+/- 11.5 kg, 38.8+/-24.0% TBSA; agents of the accident were fire/ alcohol for 10 patients and electrical trauma for two patients; inhalation injury were described for 50% of patients with fire. High pharmacokinetic variability was registered for the antifungal agent investigated. In addition, significant changes on pharmacokinetic parameters were described for fluconazole for burn patients with dialytic renal dysfunction compared to those with renal function preserved. Bioanalytical methods validated with basis on good laboratory practices (GLP), recommended by the national and international guidelines were adequate for drug plasma monitoring by liquid chromatography, UV detection. High pharmacokinetic variability was obtained for fluconazol. In conclusion, it was demonstrated that PK modeling of antimicrobial is an important tool for the control of severe systemic fungal infection in burn patients.

Key-words: burns, fungal infection, drug plasma monitoring, pharmacokinetics, HPLC-UV.

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Terapia antimicrobiana empírica estendida para pacientes grandes queimados HCFMUSP. Fonte: Guia de Utilização de Antimicrobianos e recomendações para a prevenção de infecções hospitalares, HCFMUSP, 2009-2011.....	23
Fluxograma 2 - Quantificação do Fluconazol Plasmático.....	33
Fluxograma 3 - Rotina de coleta de cultura e terapia antimicrobiana HCFMUSP para pacientes grande queimados.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Quantificação de fluconazol em plasma. Perfil cromatográfico, 10 minutos de tempo de corrida. (A) Extrato de plasma branco; (B) Limite superior de quantificação (LSQ: 100µg/mL); (C) Limite inferior de quantificação (LIQ: 0,4µg/mL); (D) Limite de detecção (LD: 0,2µg/mL). Corrida analítica: 10 min. Tempos de retenção: fluconazol (Analito: 8,4 min.) e tinidazol (PI: 6,9 min).....	39
Figura 2 -	Estudo da Especificidade do Método Bioanalítico. Perfil cromatográfico: (A) Extrato de plasma branco procedente de voluntário sadio; (B) Extrato de plasma branco hemolisado procedente de voluntário sadio; (C) Extrato de plasma branco lipêmico. Corrida analítica: 10 min.....	40
Figura 3 -	Curva de calibração diária para determinação de fluconazol plasmático através de CLAE. (0,4-100,0µg/mL).....	41
Figura 4 -	Estrutura química do fluconazol (2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis (1H-1,2,4-triazol-1-il)-2-propanol), C ₁₃ H ₁₂ F ₂ N ₆ O, PM 306,3 D. (MICROMEDEX, 2010).....	49
Figura 5 -	Alteração do regime de dose empírica de Fluconazol (400mg ao dia, sendo 200mg duas vezes ao dia) no total de 31 seguimentos realizados em 12 pacientes.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Crítérios para Terapêutica Empírica Sistêmica em Queimados.....	16
Quadro 2 -	Classificação das queimaduras.....	18
Quadro 3 -	Cálculo da Superfície Corporal Queimada.....	19
Quadro 4 -	Determinação da Extensão da Lesão com Base na Regra dos Nove.....	19
Quadro 5 -	Classificação quanto à gravidade da queimadura.....	20
Quadro 6 -	Preparação das Soluções de Trabalho (ST) do analito em diluente.....	29
Quadro 7 -	Preparação dos calibradores do analito em plasma.....	30
Quadro 8 -	Preparação das Soluções de Trabalho (ST) do analito em solução diluente para os controles internos de qualidade.....	30
Quadro 9 -	Preparação dos controles internos de qualidade do analito em plasma.....	31
Quadro 10 -	Condições cromatográficas, CLAE Labsolution, Shimadzu.....	31
Quadro 11 -	Preparação da concentração do limite inferior de quantificação.....	34
Quadro 12 -	Características dos pacientes investigados, dados individuais (n = 12).....	56
Quadro 13 -	Parâmetros farmacocinéticos após infusão múltipla no estado de equilíbrio.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Limites de confiança para o método bioanalítico.....	42
Tabela 2 -	Caracterização da população de pacientes queimados investigados.....	61
Tabela 3 -	Regime de dose e Controle Terapêutico de Fluconazol nos Pacientes.....	63
Tabela 4 -	Meia vida biológica do fluconazol, n= 31 seguimentos.....	64
Tabela 5 -	Depuração plasmática do fluconazol, n= 31 seguimentos.....	65
Tabela 6 -	Volume Aparente de Distribuição do fluconazol, n= 31 seguimentos.....	65
Tabela 7 -	Farmacocinética do fluconazol em pacientes queimados.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

ABA	American Burn Association
AMB	Associação Médica Brasileira
ASC ^{ss} _τ	Área sobre a curva no estado de equilíbrio intervalo 0-24hs
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Ultravioleta
C ^{ss} _{max}	Concentração máxima no estado de equilíbrio
C ^{ss} _{min}	Concentração mínima no estado de equilíbrio
CIM	Concentração inibitória mínima
CL _{CR}	<i>Clearance</i> de creatinina
CL _T	Depuração total do fármaco
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CCal	Controle de calibração
CFM	Conselho Federal de Medicina
CQ	Controle de Qualidade
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
r ²	Coefficiente de correlação linear
Cr	Creatinina
CV%	Coefficiente de Variação
DP	Desvio padrão
EDTA	Etilenodiaminotetracético sal sódico
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gravidade
°C	Graus Celsius
h	Hora
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IC95%	Intervalo de Confiança 95%
τ	Intervalo entre doses
Kg	Quilograma
L	Litros
LD	Limite de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
LI IC95%	Limite inferior do intervalo de confiança 95%
LS IC95%	Limite superior do intervalo de confiança 95%
>	Maior
<	Menor
m ²	Metro quadrado
t _{1/2β}	Meia-vida biológica
μL	Microlitro(s)
μg	Micrograma(s)
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
M	Molar
N ₂	Nitrogênio
NAP	Não aplicável
ND	Não detectado
nm	Nanômetro
NaOH	Hidróxido de sódio
p	Significância estatística
PI	Padrão Interno

%	Porcentagem
RA	Razão da área
SBCP	Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica
SCQ	Superfície corpórea queimada
SD	Solução diluente
SP	Solução padrão
SPI	Solução padrão interno
ST	Solução de trabalho
STCQA	Solução de trabalho de controle de qualidade alto
STCQB	Solução de trabalho de controle de qualidade baixo
STCQM	Solução de trabalho de controle de qualidade médio
RE	Resolução
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
Vd	Volume aparente de distribuição
Vmax	Valor máximo
Vmin	Valor mínimo
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
Revisão da Literatura.....	16
OBJETIVOS	24
CAPÍTULO 1	25
1.1 INTRODUÇÃO.....	26
1.2 OBJETIVO.....	27
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
1.3.1 Padrões, Reagentes e Soluções.....	28
1.3.2 Preparo das soluções padrão do analito e padrão interno.....	28
1.3.3 Instrumentação analítica e condições cromatográficas.....	31
1.3.4 Procedimento de purificação da matriz biológica (plasma).....	32
1.3.5 Validação do método analítico.....	34
1.4 RESULTADOS.....	39
1.4.1 Perfil Cromatográfico.....	39
1.4.2 Especificidade.....	40
1.4.3 Revalidação do Método Bioanalítico - Linearidade e Curva de Calibração.....	41
1.4.4 Limite de quantificação e limite de detecção.....	42
1.4.5 Precisão, exatidão e recuperação.....	42
1.4.6 Estabilidade do Fluconazol.....	43
1.5 DISCUSSÃO.....	44
1.6 CONCLUSÃO.....	46
CAPÍTULO 2	47
2.1 INTRODUÇÃO.....	48
2.2 OBJETIVO.....	51
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
2.3.1 Local do Estudo.....	52
2.3.2 Considerações Éticas.....	54
2.3.3 CASUÍSTICA.....	55
2.3.4 PROTOCOLO CLÍNICO.....	57
2.3.5 ETAPA ANALÍTICA.....	58
2.3.6 ETAPA ESTATÍSTICA.....	60
2.4 RESULTADOS.....	61
2.5 DISCUSSÃO.....	68
2.6 CONCLUSÕES.....	71
CONCLUSÕES GERAIS	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	77

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa FCF/USP

ANEXO B – Aprovação CAPEPesq HCFMUSP

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

INTRODUÇÃO

Após uma injúria térmica, órgãos e sistemas, entre eles, o sistema cardiovascular, os rins e o fígado, sofrem mudanças fisiopatológicas dinâmicas, devendo-se esperar então uma profunda alteração na farmacocinética de todos os fármacos de administração sistêmica no paciente grande queimado. A queimadura apresenta uma maior incidência de sepse quando comparada a outros tipos de trauma. A susceptibilidade dos queimados às infecções se deve à perda da primeira linha de defesa contra a invasão microbiana causada pelo rompimento da barreira da pele, a presença de tecido desvitalizado (escara do queimado) que proporciona um ambiente favorável para o crescimento bacteriano e de fungos; as alterações nos componentes específicos e não específicos do sistema imune após injúria térmica, e as alterações na resposta imune celular e humoral (BANG *et al.*, 1998; BOUCHER *et al.*, 1992).

Sob situação de *stress*, os pacientes em estado crítico, hiperdinâmico ou em sepse, apresentam alterações relacionadas ao volume aparente de distribuição, meia vida biológica e depuração plasmática. Sabe-se que os pacientes grandes queimados apresentam alterações na disposição cinética de fármacos em geral e, conseqüentemente, os agentes anti-infecciosos estão incluídos. Assim, revisões recentes relacionadas ao monitoramento plasmático desses agentes apontam a alta variabilidade da farmacocinética como responsável pela ineficácia da farmacoterapia instituída (BLANCHET *et al.*, 2008; FRY, 1996).

Esses pacientes constituem um grupo bastante heterogêneo de indivíduos em função do tipo da queimadura, da extensão e profundidade da lesão. Por outro lado, reportaram-se variações significativas nas concentrações plasmáticas inter-pacientes para esses agentes anti-infecciosos. Considerar-se ainda a variabilidade intra-paciente nas concentrações plasmáticas nos diferentes estágios do tratamento do grande queimado em função da profundidade e extensão da lesão ativa, da alteração de compartimentos fluidos, do grau de integridade das barreiras bem como a maior ou menor perda de líquidos através das lesões (BLANCHET *et al.*, 2008; GARRELTS; PETERIE, 1988; WEINBREN, 1999).

Com relação à farmacoterapia a ser instituída no controle das infecções em grandes queimados, os critérios recomendados estão documentados no “Guia de Utilização de Anti-infecciosos e Recomendações para a Prevenção de Infecções Hospitalares” são descritos a seguir no quadro 1 (HCFMUSP, 2009-2011). Ressalta-se que a terapêutica sistêmica inicial desses agentes no caso de pacientes queimados tem registrado a necessidade da intervenção médica com relação à alteração do regime empírico inicial (SANTOS *et al.*, 2010).

Quadro 1 - Critérios para Terapêutica Empírica Sistêmica em Queimados.

Grande Queimado
Critérios para Terapêutica Empírica Sistêmica
Iniciar antimicrobiano sistêmico quando se observarem dois dos critérios abaixo:
1. Leucopenia (< 2500/mm ³)
2. Aprofundamento do grau da queimadura (exceto em queimadura elétrica) ou febre (> 38,5°C) ou hipotermia (<36°C)
3. Instabilidade hemodinâmica após correção hidroeletrólítica
4. Celulite
5. Confusão mental (sem outra causa) ou hiperglicemia (> 150 mg/dl sem diabetes prévia)

Fonte: HCFMUSP, 2009-2011

Revisão da Literatura

Considera-se a pele como um órgão essencial para a sobrevivência, que apresenta como função principal uma barreira de proteção. A camada epidérmica superior é constituída pela camada de células mortas e queratina, formando uma barreira contra bactérias e toxinas, enquanto que as células epidérmicas basais são precursoras de novas células epidérmicas; a superfície ondulada da epiderme, denominada invaginação, aumenta a aderência da epiderme à derme através da membrana basal. A derme é constituída pelas camadas papilar e reticular que desempenham diversas funções essenciais, incluindo a restauração contínua da epiderme; de acordo com a profundidade da queimadura, considera-se que camada papilar apresente maior atividade biológica que a reticular, pois aumenta o tempo requerido na reabilitação se os

componentes papilares são perdidos nas queimaduras mais profundas (DE SANTI, 2005; KECK, 2009).

A Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica (SBCP) em colaboração com o Conselho Federal de Medicina (CFM) através do “Projeto Diretrizes” promovido pela Associação Médica Brasileira define “Queimaduras são lesões dos tecidos orgânicos em decorrência de trauma de origem térmica resultante da exposição ou contato com chamas, líquidos quentes, superfícies quentes, eletricidade, frio, substâncias químicas, radiação, atrito ou fricção” (AMB, 2008a).

Nos primeiros dias pós-lesão térmica, durante o seguimento do paciente queimado na unidade de terapia intensiva, o fator agravante principal é o *burn shock* (choque em decorrência da queimadura). Durante as primeiras semanas, segue-se um período de risco aumentado de sepse, e por fim em decorrência de contração e epitelização do tecido, em maior ou menor proporção, permanecem as deformidades pós-queimaduras (SHERIDAN, 2002).

No período compreendido entre 1995 e 2005, registrou-se taxa de sobrevivência de 94,4% de pacientes com superfície corpórea queimada (SCQ) superior a 30%. O fogo (46%), o escaldado (32%), objetos quentes (8%), trauma elétrico (4%), agente químico (3%) foram as principais causas de queimadura; de acordo com a “Sociedade Americana de Queimaduras”, nos Estados Unidos da América do Norte em 2007, registraram-se 500 mil pacientes queimados recebendo tratamento, gerando 40 mil hospitalizações e quatro mil mortes por fogo (ABA, 2010). Estima-se que no Brasil ocorram em torno de 1 milhão de acidentes de queimaduras por ano, sendo que 100 mil pacientes procuram atendimento hospitalar, e desses, cerca de 2.500 pacientes vão a óbito em decorrência direta ou indireta das lesões (GOMES; SERRA; MACEIRA, 2001)

Nos últimos 20 anos, registrou-se redução considerável das hospitalizações e mortes relacionadas a queimaduras, devido à prevenção desses acidentes e aos avanços no seguimento do paciente queimado na UTI resultante do melhor entendimento da resposta fisiopatológica pós-queimadura. Atualmente, os principais avanços que contribuíram na redução dos óbitos estão relacionados aos procedimentos de ressuscitação, suporte à resposta hipermetabólica, controle da dor e das infecções nas fases precoce e tardia, bem como os cuidados à lesão inalatória do paciente queimado, além de

tratamento cirúrgico agressivo e cobertura da ferida (DE SANTI, 2005; KECK, 2009).

Com referência ao diagnóstico da gravidade das queimaduras, a SBCP considera basicamente o agente, a extensão e a profundidade da lesão, bem como a localização das áreas afetadas, além da complexidade da queimadura em si; de acordo com o agente etiológico, as queimaduras podem ser de origem térmica, química, trauma elétrico, por radiação ou atrito (AMB, 2008a). Com relação à profundidade da lesão as queimaduras podem se de primeiro, segundo e terceiro grau conforme referido no quadro 2.

Quadro 2 - Classificação das queimaduras

Classificação das queimaduras de acordo com a profundidade		
Grau	Profundidade	Sinais
Primeiro	Lesões apenas da Epiderme	Eritema
Segundo	Lesões da Epiderme e parte da Derme	Eritema + Bolha
Terceiro	Lesões da Epiderme e da Derme	Branca Nacarada

Fonte: AMB/CFM, 2008

A gravidade da lesão pode ser determinada a partir da idade do paciente, profundidade, tamanho e localização da lesão; uma vez que lactentes e idosos apresentam taxa de mortalidade maior do que as demais faixas etárias, considera-se que a idade do paciente seja o fator de maior impacto no prognóstico (DE SANTI, 2005). A superfície corpórea queimada deve ser estimada com base na extensão da queimadura e regiões afetadas conforme referido e ilustrado nos quadros 3 e 4.

Quadro 3 - Cálculo da Superfície Corporal Queimada

Regra dos nove para calcular a superfície corporal queimada para ser usada apenas no pronto atendimento ⁶ (D).					
Paciente:	Enf.:		Leito:		
Área	Adulto	Criança até 9 anos	2º Grau	3º Grau	Total da Área Queimada
Cabeça e Pescoço	9%	18% - idade em anos			
Membro Superior Direito	9%	9,0%			
Membro Superior Esquerdo	9%	9,0%			
Tronco Anterior	18%	18,0%			
Tronco Posterior	18%	18,0%			
Genitália	1%				
Coxa Direita	9%	7% + 1/4 idade em anos			
Coxa Esquerda	9%	7% + 1/4 idade em anos			
Perna e Pé Direitos	9%	7% + 1/4 idade em anos			
Perna e Pé Esquerdos	9%	7% + 1/4 idade em anos			
Total da Área Queimada					

Fonte: AMB/CFM, 2008

Quadro 4 – Determinação da Extensão da Lesão com Base na Regra dos Nove



Fonte: AMB/CFM, 2008

Os pacientes podem de forma simplificada ser classificados de acordo com a gravidade da queimadura como pequeno, médio e grande queimado conforme resumido no quadro 5.

Quadro 5 - Classificação quanto à gravidade da queimadura

Gravidade	Profundidade da Queimadura		
	1º grau	2º grau	3º grau
Pequena	qualquer extensão e/ou idade	5% (<12 anos) 10% (>12anos)	
Média		5-15% (<12 anos) 10-20% (>12anos)	5% (<12 anos) 10% (>12anos)
		mão/pé/face/pescoço/ axila/grande articulação (qualquer idade)	qualquer queimadura, exceto mão/face/períneo (qualquer idade)
Grande		>15% (<12 anos) >20% (>12anos)	>5% (<12 anos) >10% (>12anos)
		períneo (qualquer idade)	períneo/mão/pé/face/pescoço/axila (qualquer idade)

Fonte: AMB/CFM, 2008

No caso de pacientes grandes queimados, devem ser consideradas ainda as queimaduras de qualquer extensão que tenham associadas uma ou mais das seguintes situações tais como corrente elétrica, lesão inalatória, politrauma, fratura óssea, trauma craniano, choque, insuficiências renal aguda, cardíaca ou hepática, diabetes, distúrbios de coagulação e hemostasia, embolia pulmonar, infarto agudo do miocárdio, infecção grave e síndrome do túnel do carpo.

Com relação à fisiopatologia do paciente queimado, resposta local à queimadura envolve tanto a coagulação do tecido quanto à reação microvascular da derme ao redor da extensão da lesão. A perda da função de barreira da pele leva às complicações mais comuns da queimadura tais como infecções, perda de calor, aumento da perda de água e mudanças nas funções de interação sociais como aparência e toque (KECK *et al.*, 2009; SHERIDAN, 2002).

A perda primária de tecido ocorre como resultado da desnaturação protéica secundária ao agente da queimadura. Este processo é seguido rapidamente pela ativação dos mediadores inflamatórios. Os agentes oxidantes e proteases causam à pele e às células endoteliais capilares mais danos, potencializando a necrose tecidual isquêmica. O rompimento da ligação do colágeno leva à desregulação do gradiente de pressão osmótico e hidrostático,

resultando em edema local e grande perda de fluidos. Ao nível molecular, tanto a ativação do complemento quanto a estimulação dos neutrófilos intravasculares resulta na produção de radicais livres. O aumento da atividade histamínica, somado às propriedades catalíticas da xantina oxidase, leva ao aumento progressivo da permeabilidade vascular. Além disto, os subprodutos tóxicos da xantina oxidase, incluindo o peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, levam a um dano direto nas estruturas dérmicas. (KECK *et al.*, 2009)

A resposta sistêmica é uma consequência das alterações descritas acima. Quando o tamanho da queimadura excede 20-30% da superfície corpórea, ocorre o aparecimento do edema intersticial em órgãos e tecidos moles, secundário à liberação de mediadores e hipoproteinemia. Este edema é aumentado pelo procedimento de ressuscitação, tornando-se uma complicação séria, pois reduz a difusão de oxigênio no tecido levando à isquemia em células já comprometidas, com reduzido fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, aumentando o risco de infecções. (KECK *et al.*, 2009; SHERIDAN, 2002)

Além disto, lesões cutâneas que representem mais de 1/3 da superfície corpórea do paciente resultam invariavelmente em *burn shock*, devido tanto à hipovolemia quanto aos mediadores da inflamação, com efeitos na microcirculação e no funcionamento do coração, veias de grande calibre e pulmões. Mesmo que a hipovolemia seja corrigida, independentemente do aumento de volume ocorre aumento na resistência pulmonar e vascular sistêmica e a depressão do miocárdio. Tal disfunção cardiovascular pode exacerbar ainda mais a resposta inflamatória entrando, desta forma, em um círculo vicioso e acelerando a disfunção orgânica. (KECK *et al.*, 2009).

Após a fase de ressuscitação, ocorre uma resposta hipermetabólica: dobrando o débito cardíaco e o gasto de energia, aumento da gluconeogenese, resistência à insulina e aumento do catabolismo protéico. Apesar destas reações ainda serem em parte desconhecidas, acredita-se que seja resultado da combinação dos fatores relacionados a mudanças na função hipotalâmica, aumento na secreção do glucagon, cortisol e catecolaminas, disfunção na barreira gastrointestinal e translocação, crescimento bacteriano no tecido queimado e perda de calor através da lesão (SHERIDAN, 2002).

Recomenda-se que o tratamento do paciente queimado seja realizado em duas etapas (AMB, 2008b):

- Tratamento sintomático (medicamentoso e laboratorial): reposição hidro-eletrolítica, transfusão sanguínea, terapia anti-infecciosa, analgesia, controles laboratoriais.
- Tratamento da lesão (cirúrgico):
 - Desbridamento cirúrgico: indicado praticamente em todos os casos de queimaduras de segundo e terceiro grau. Deve ser realizado no centro cirúrgico, sob anestesia. Envolve a retirada mecânica de todo o tecido necrótico (epiderme/derme) além da remoção de contaminantes como restos de roupa, medicamentos caseiros, e a limpeza cuidadosa da lesão queimada. O desbridamento é seguido por curativos com ou sem anestesia, em intervalos de 12 horas até 24 a 36 horas, dependendo da extensão e da gravidade da lesão.
 - Enxerto: é realizado para se obter o fechamento da ferida de terceiro grau. Pode ser realizado imediatamente após a excisão, ou mais tardiamente, em feridas que evoluíram com tecido de granulação.
 - Reconstrução da área lesionada.

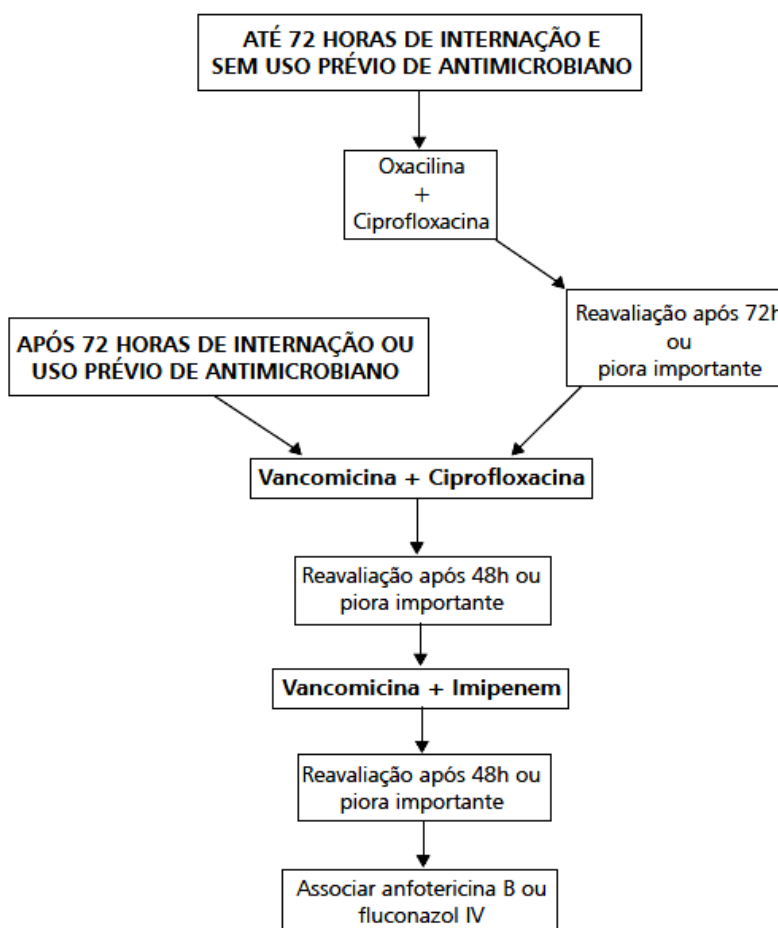
Com relação ao tratamento com os agentes anti-infecciosos, atualmente, o protocolo de terapia antimicrobiana recomendado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para os pacientes grandes queimados consta de oxacilina associada à ceftriaxona ou ao ciprofloxacino, até 72 horas da internação sem uso de antimicrobianos, isto é na fase precoce do paciente na UTI para cobertura contra os germes de infecção da comunidade. Por outro lado com o objetivo de reduzir a morbidade e mortalidade desses pacientes, a partir de 72 horas de internação, utilizam-se o cefepime, o imipenem e a vancomicina na fase tardia da internação na UTI, para a cobertura contra os germes hospitalares (HCFMUSP, 2009-2011).

No caso de pacientes suscetíveis, que apresentaram convulsão, recomenda-se a substituição do cefepime pela associação piperacilina-tazobactam. Nos casos de re-infecções pelos germes hospitalares, ou até mesmo na fungemia que ocorre geralmente em pacientes imunossuprimidos de internação prolongada, utilizam-se adicionalmente a linezolida, a polimixina E, o fluconazol, anfotericina B ou a caspofungina, dependendo da cepa isolada e/ou das condições clínicas do paciente.

Desta forma, o monitoramento terapêutico dos agentes anti-infecciosos nos grandes queimados é importante em decorrência da imprevisibilidade da farmacocinética e da necessidade de terapia dose ajustada em substituição a terapia inicial recomendada. O esquema terapêutico empírico para o controle das infecções que é atualmente também estendido aos pacientes grandes queimados encontram-se sumarizados no fluxograma referido a seguir, “Guia de Utilização de Anti-infecciosos e Recomendações para a Prevenção de Infecção Hospitalar (HCFMUSP, 2009-2011).

Grande Queimado

Esquema Terapêutico Empírico para Infecções



Fluxograma 1 – Terapia antimicrobiana empírica estendida para pacientes grandes queimados HCFMUSP. Fonte: Guia de Utilização de Antimicrobianos e recomendações para a prevenção de infecções hospitalares, HCFMUSP, 2009-2011.

OBJETIVO

Após revalidação da metodologia analítica em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) para determinação do fluconazol plasmático, investigar sua farmacocinética durante o seguimento dos pacientes queimados internados na UTI.

Capítulo 1

Revalidação do Método Analítico para Quantificação do Fluconazol em Plasma por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

1.1 INTRODUÇÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método físico-químico que apresenta alta seletividade, precisão e exatidão além de manter a integridade da amostra no extrato da matriz biológica. Por outro lado, a sofisticação da instrumentação analítica, a complexidade de operacionalização, a exigência de analista treinado e utilização de *softwares* específicos podem ser consideradas como desvantagem de sua aplicação relativamente aos bioensaios e imunoenaios. Entretanto a falência terapêutica decorrente da utilização de imunoenaios ou de bioensaios não ocorre quando se monitoram as concentrações plasmáticas de fármacos em geral por CLAE. É devido a esses fatores que o ajuste de dose para todos os pacientes queimados é de relevância clínica, sendo considerada sustentação laboratorial fundamental no seguimento do tratamento.

A escolha do método cromatográfico é adequada se considerarmos a seletividade e a eficiência da técnica associada ao sucesso terapêutico, à redução do tempo do tratamento e internação, à recuperação do paciente e a sua re-introdução na sociedade com número mínimo de seqüelas.

A quantificação do fluconazol na matriz biológica (plasma) foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência CLAE-UV. Aplicou-se o método bioanalítico desenvolvido anteriormente por Santos *et al.* (2010) com pequenas adaptações, seguido de revalidação dessa metodologia. Desta forma, aplicou-se esse método revalidado no monitoramento plasmático do fluconazol no seguimento dos pacientes queimados da UTI.

1.2 OBJETIVO

Revalidar a metodologia analítica em CLAE-UV para determinação do fluconazol em matriz biológica.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Padrões, Reagentes e Soluções

Foram utilizados os solventes, grau cromatográfico CARLO ERBA (Milão, Itália) e TEDIA (Ohio, USA) nos procedimentos de extração líquido-líquido e na análise quantitativa do fármaco. A água ultrapura obtida através do sistema GEHAKA (São Paulo, Brasil) foi utilizada na preparação da solução tampão requerida na fase móvel de cromatografia, na limpeza da tubulação e coluna analítica bem como na regeneração do cromatógrafo líquido. A fase móvel foi desgaseificada em ultra-som. O monitoramento do pH da fase móvel foi efetuada através de medidor de pH com eletrodo específico DM22, DIGIMED (São Paulo, Brasil).

Utilizaram-se como padrões de referência do analito, o fluconazol lote FOD202, *United States Pharmacopeia* (Rockville, USA) e para o padrão interno, o tinidazol, lote TNZ/5120884, AARTI DRUGS (Mumbai, Índia). Os padrões de referência foram acondicionados em frasco âmbar com tampa, e armazenados em dessecador com indicador de umidade em laboratório climatizado e mantido ao abrigo da luz.

1.3.2 Preparo das soluções padrão do analito e padrão interno

1.3.2.1 Preparo da Solução Padrão de Fluconazol (SP)

Pesou-se o equivalente a 5,00mg de fluconazol em balão volumétrico (5 mL) em balança semi-micro analítica XS205DU, METTLER-TOLEDO (Zurique, Suíça); dissolveu-se com mistura constituída por água ultrapura e acetonitrila (80:20 v/v) e completou-se o volume do balão para obter uma concentração final equivalente à SP:1000µg/mL, solução estoque.

1.3.2.2 Preparo da Solução Padrão Interno de Tinidazol (SPI)

Pesou-se o equivalente a 1,00mg de tinidazol em balão volumétrico (10 mL) em balança semi-micro analítica XS205DU, METTLER-TOLEDO (Zurique, Suíça), dissolveu-se com a solução diluente (SD), constituída por água ultrapura e acetonitrila (80:20 v/v) e completou-se o volume do balão para obter uma

concentração final equivalente à SPI:100µg/mL, solução estoque. Em seguida, preparou-se a solução de adição de tinidazol na concentração de 40µg/mL, a partir da solução estoque anterior, pela transferência de 4mL da SPI para outro balão volumétrico (10mL), completando-se o volume com a solução diluente.

Os padrões do analito na solução diluente contendo fluconazol foram preparados pela adição do volume apropriado de solução estoque do analito, para se obter concentrações representadas no quadro 6.

Quadro 6 - Preparação das Soluções de Trabalho (ST) do analito em diluente

Identificação	Tomada de ensaio (mL)	Volume de SD (mL)	Volume final (mL)	Concentração do analito (µg/mL)
SP	-	-	-	1000
ST 1	2,5 mL da SP	2,5	5,0	500
ST 2	2,0 mL da ST 1	3,0	5,0	200
ST 3	2,5 mL da ST 2	2,5	5,0	100
ST 4	2,5 mL da ST 3	2,5	5,0	50
ST 5	2,0 mL da ST 4	3,0	5,0	20
ST 6	2,5 mL da ST 5	2,5	5,0	10
ST 7	2,0 mL da ST 6	3,0	5,0	4

Abreviaturas: SP: solução padrão; ST1-7: solução de trabalho 1-7; SD: solução diluente: água e acetonitrila (80:20, v/v).

Os padrões do analito contendo fluconazol em plasma foram preparados pela adição do volume apropriado de solução intermediária, para se obter concentrações plasmáticas do analito, quadro 7.

Quadro 7 – Preparação dos calibradores do analito em plasma.

Identificação	Tomada de ensaio (µL)	Volume de plasma (mL)	Volume final (mL)	Concentração do analito (µg/mL)
Branco	250 µL SD	2,25	2,5	0
Zero	250 µL SD	2,25	2,5	0
CCal 0,4µg/mL	250 µL ST 7	2,25	2,5	0,4
CCal 1,0 µg/mL	250 µL ST 6	2,25	2,5	1,0
CCal 2,0 µg/mL	250 µL ST 5	2,25	2,5	2,0
CCal 5,0 µg/mL	250 µL ST 4	2,25	2,5	5,0
CCal 10,0 µg/mL	250 µL ST 3	2,25	2,5	10,0
CCal 20,0 µg/mL	250 µL ST 2	2,25	2,5	20,0
CCal 50,0 µg/mL	250 µL ST 1	2,25	2,5	50,0
CCal 100,0 µg/mL	250 µL SP	2,25	2,5	100,0

Abreviaturas: CCal: controle de calibração; SD: solução diluente; ST 1-7: solução de trabalho; SP: solução padrão

As soluções de trabalho requeridas na preparação dos controles internos de qualidade (CQs), alto (CQA), médio (CQM) e baixo (CQB) do fluconazol em plasma foram diluídas a partir da solução estoque com solução diluente, quadro 8.

Quadro 8 - Preparação das Soluções de Trabalho (ST) do analito em solução diluente para os controles internos de qualidade

Identificação	Tomada de ensaio (mL)	Volume de SD (mL)	Volume final (mL)	Concentração do analito (µg/mL)
STCQA	4,5 mL da SP	0,5	5,0	900
STCQM	2,5 mL da STCQA	2,5	5,0	450
STCQB	1,2 mL da ST 4	3,8	5,0	12

Abreviaturas: SP: solução padrão; SD: solução diluente; ST: solução de trabalho; STCQA: solução de trabalho de controle de qualidade alto; STCQM: solução de trabalho de controle de qualidade médio; STCQB: solução de trabalho de controle de qualidade baixo.

Os controles internos de qualidade (CQs) foram preparados em três concentrações alto (CQA), médio (CQM) e baixo (CQB) pela adição de plasma branco testado e aprovado às respectivas diluições das soluções preparadas anteriormente, quadro 9.

Quadro 9 – Preparação dos controles internos de qualidade do analito em plasma.

Identificação	Tomada de ensaio (µL)	Volume de plasma (mL)	Volume final (mL)	Concentração do analito (µg/mL)
CQB	250 µL STCQB	4,75	5,0	1,2
CQM	250 µL STCQM	4,75	5,0	45
CQA	250 µL STCQA	4,75	5,0	90

Abreviaturas: STCQA: solução de trabalho de controle de qualidade alto; STCQM: solução de trabalho de controle de qualidade médio; STCQB: solução de trabalho de controle de qualidade baixo; CQA: controle de qualidade alto; CQM: controle de qualidade médio; CQB: controle de qualidade baixo.

1.3.3 Instrumentação analítica e condições cromatográficas

Utilizou-se o cromatógrafo líquido SHIMADZU (Kyoto, Japão) constituído por bomba LC-20 AT, equipado com um controlador CBM 20A e programa LabSolution, injetor automático SIL 20A, detector SPD-20A, operando no ultravioleta em laboratório climatizado. Na separação cromatográfica utilizou-se fase móvel binária, em sistema isocrático de eluição, preparada diariamente e desgaseificada (ultrasom por 10 min.) O detalhamento das condições cromatográficas encontra-se no quadro 10.

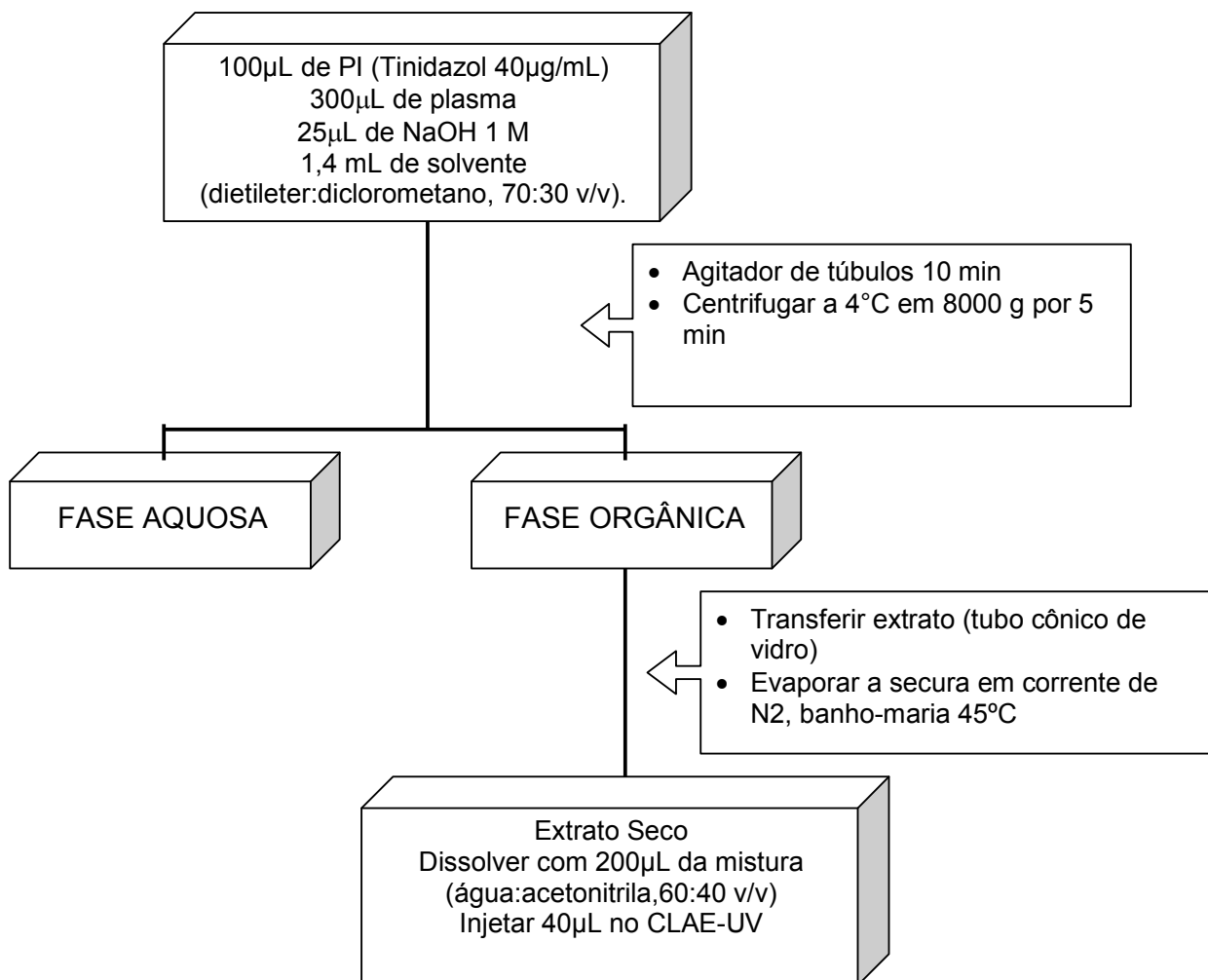
Quadro 10 – Condições cromatográficas, CLAE Labsolution, Shimadzu

Parâmetro	Condição analítica
Coluna	Shimpack CLC-CN (150x6 mm 5micra)
Deteção	Ultravioleta 210 nm
Fase móvel	Água:Acetonitrila (60:40, v/v)
Padrão Interno	Tinidazol
Fluxo (mL/min)	1 mL/min
Separação analítica	Temp ambiente
Volume de Injeção	40 µL
Tempo de retenção do analito	8,4 minutos
Tempo de retenção do padrão interno	6,9 minutos
Tempo total de corrida	10,0 minutos

1.3.4 Procedimento de purificação da matriz biológica (plasma)

Utilizou-se a extração líquido-líquido para a purificação do plasma para determinação do fluconazol. Transferiu-se para tubo de Eppendorf 300 μL de plasma, 100 μL de tinidazol 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 μL de hidróxido de sódio (1M) e 1,4mL da mistura de solvente constituída por dietiléter e diclorometano (70:30 v/v) seguido de agitação por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados durante 5 minutos em 8000g a 4°C. Transferiu-se 1000 μL de sobrenadante para tubo de vidro para evaporação do solvente sob fluxo de nitrogênio em banho-maria a temperatura a 45°C. O resíduo foi dissolvido com 200 μL de mistura de água e acetonitrila (60:40 v/v) por 30 segundos em agitador de tubos com bandeja adaptada. O extrato purificado foi transferido para o *insert* adaptado ao *vial* e volumes de 40 μL foram injetados no CLAE.

Fluxograma 2 – Quantificação do Fluconazol Plasmático



Condições cromatográficas:

Cromatógrafo líquido SHIMADZU LC-20 AT; Coluna Shimpack CLC-CN;

Fase Móvel água: acetonitrila (60:40, v/v); Fluxo: 1,0 mL/min.

Detector UV SPD-20A, λ : 210nm; Autosampler SIL20A;

1.3.5 Validação do método analítico (BRASIL, 2003; FDA, 2001)

A revalidação do método bioanalítico reportado no presente estudo atendeu a recomendação da ANVISA/RE n°899 para métodos bioanalíticos (BRASIL, 2003) e pelo FDA (FDA, 2001) para métodos bioanalíticos. Realizou-se a revalidação da metodologia para a quantificação de fluconazol em plasma.

Determinaram-se os limites de confiança: linearidade, limite de sensibilidade e limite de quantificação, precisão e exatidão intra e inter-dias, além de estudos de estabilidade de curta duração. Os resultados obtidos foram expressos através de média, desvio padrão e coeficiente de variação.

1.3.5.1 Especificidade

Especificidade é definida como a capacidade do método em diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes da amostra. Analisaram-se amostras da matriz biológica (plasma) obtidas de seis indivíduos sob condições controladas referentes a tempo e alimentação, sendo quatro amostras procedentes de indivíduos saudáveis, uma lipêmica e uma hemolisada. Cada amostra foi testada utilizando o procedimento e as condições cromatográficas propostas no presente estudo. Os resultados foram comparados e sobrepostos aos cromatogramas com a concentração preparada para o Limite Inferior de Quantificação (LIQ) referida no quadro 11.

Quadro 11 – Preparação da concentração do limite inferior de quantificação

Identificação	Tomada de ensaio (µL)	Volume de plasma (mL)	Volume final (mL)	Concentração do analito (µg/mL)
LIQ	250 µL ST 7	2,25	2,5	0,4

Abreviaturas: ST: solução de trabalho; LIQ: limite inferior de quantificação.

Rejeitou-se qualquer amostra de plasma branco que apresentasse interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, metabólito ou padrão interno. Caso uma ou mais das amostras analisadas apresentassem tal interferência, novas amostras de outros seis indivíduos devem ser testadas. Caso uma ou mais das amostras deste grupo apresentassem interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, o método deveria ser alterado

visando eliminá-la; uma vez que isso não ocorreu, o método permaneceu sem alteração relativamente às condições de desenvolvimento e validação proposta.

A resposta de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco deveria ser inferior a 20% da resposta do LIQ. Adicionalmente para os picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno considerou-se limite inferior a 5% da resposta na concentração utilizada do mesmo no ensaio de quantificação do analito.

1.3.5.2 Limite de Detecção e Quantificação

Limite de detecção (LD), definido como a metade do limite de quantificação. é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

Por outro lado, limite inferior de quantificação (LIQ) representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (inferior a 20%) sob as condições experimentais estabelecidas.

Adicionalmente, a legislação relativa à validação de métodos bioanalíticos nacional e internacional preconiza que o sinal mensurado seja da ordem de três e cinco vezes do ruído da linha de base, respectivamente para o LIQ e o LD. Os limites de detecção e quantificação foram determinados baseados na análise de 10 replicadas.

1.3.5.3 Linearidade

É o parâmetro da validação da metodologia bioanalítica que indica a proporcionalidade entre (X) faixa de concentração do analito na amostra, e (Y) resposta do instrumento de medida. A equação da reta: $Y=aX+b$ evidencia boa correlação linear entre Y e X, quando a correlação se aproxima da unidade; o valor mínimo aceitável para esse coeficiente de correlação (r^2) é equivalente à 0,99.

1.3.5.4 Curva de calibração

A curva de calibração foi preparada obtendo-se as concentrações descritas no quadro 7, foi armazenada em congelador (20°C negativos) até o momento do ensaio. Os respectivos padrões internos foram preparados a partir das soluções estoque (1mg/mL) distribuído em alíquotas e armazenado em congelador (20°C negativos) até o ensaio. Plotou-se o valor nominal para cada concentração plasmática de fármaco *versus* a respectiva razão da área do pico do fármaco e padrão interno, obtendo-se o coeficiente de correlação linear de no mínimo 0,99 e a equação da reta. Ao menos cinco dos oito calibradores foram considerados para a construção diária da curva de calibração diária de forma a alcançar de 80% a 120% da concentração teórica do teste.

Os controles de qualidade internos, quadro 9, foram preparados em duplicata e analisados durante cada corrida analítica para garantir a aceitação da mesma. Uma corrida foi aceita quando pelo menos quatro dos seis controles mostraram um desvio comparado com o seu valor nominal inferior à 15%. Uma vez aprovada, a curva de calibração foi utilizada para a quantificação do fluconazol nas amostras coletadas dos pacientes investigados neste protocolo clínico.

1.3.5.5 Estudo de recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Corresponde, portanto, a razão entre o dado obtido pela análise da amostra submetida à extração *versus* o dado obtido pela análise da amostra não submetida a esse procedimento. As porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximas a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores inferiores, desde que a recuperação seja precisa e exata. Este teste deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos a partir de três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método.

1.3.5.6 Recuperação absoluta

A recuperação absoluta expressa a percentagem do analito ou do padrão interno adicionado que foi extraído e quantificado. Comparam-se alíquotas extraídas (X%) *versus* não extraídas (100%).

A recuperação absoluta do analito foi determinada utilizando os controles de qualidade em três replicatas, expressa em porcentagem. Adicionalmente, investigou-se a recuperação absoluta do padrão interno, e também o resultado obtido foi expresso em porcentagem.

$$\text{Recuperação absoluta (\%)} = \frac{(\text{Área do pico})_{\text{extraída}}}{(\text{Área do pico})_{\text{não extraída}}} \times 100$$

1.3.5.7 Exatidão

A exatidão intra-dias é mensurada pelo desvio do valor real e o valor obtido de concentração do analito na corrida analítica do dia, enquanto que a exatidão inter-dias é avaliada pelo desvio do valor real e o valor obtido de concentração do analito durante três dias consecutivos.

A exatidão do método foi avaliada utilizando três concentrações (baixo, médio e alto) em seis replicatas, e o erro sistemático do ensaio foi determinado baseado na porcentagem de inexatidão e calculado de acordo com a equação.

$$\text{Inexatidão (\%)} = \frac{\text{Valor obtido} - \text{Valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

O desvio não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite valores inferiores ou equivalente à 20%.

1.3.5.8 Precisão intradia e inter-dias

Precisão representa a reprodutibilidade dos resultados obtidos pela análise quantitativa de três concentrações (baixa, média e alta) em duplicata. A precisão intradia foi avaliada com base na análise de duplicatas de três concentrações, enquanto que para a determinação da precisão inter-dias, essas análises foram realizadas em três dias consecutivos totalizando dezoito ensaios para cada método validado. O resultado obtido foi expresso em coeficiente de variação (%), não se admitindo valores superiores a 15%.

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

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

1.3.5.9 Estabilidade

Como critério aceitável na determinação da estabilidade do analito no plasma, adotou-se variação inferior a 15% para todas as concentrações estudadas.

- Ciclos de congelamento e descongelamento do fármaco em matrizes biológicas: analisaram-se amostras em triplicata (três concentrações), e em três dias consecutivos para a estudo de estabilidade dos ciclos 1, 2 e 3 de congelamento e descongelamento. As amostras contendo o analito foram mantidas congeladas por 24 horas (20°C negativos), sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, retirou-se uma alíquota de cada concentração; as amostras foram novamente congeladas por 24 horas, repetiu-se a retirada de nova alíquota de cada uma das três concentrações, até completar os três ciclos de congelamento e descongelamento. Os resultados foram comparados com os obtidos pela análise do analito nas amostras recém-preparadas.
- Estabilidade pós-processamento: esse parâmetro foi determinado a partir da análise de amostras extraídas (três concentrações em triplicata), mantendo-se os extratos purificados à temperatura ambiente na bandeja do injetor automático no tempo máximo equivalente a validade da corrida analítica.
- Estabilidade de curta duração do analito na matriz biológica em bancada: analisaram-se amostras de três concentrações que permaneceram à temperatura ambiente por 4 horas até o ensaio.

Os resultados obtidos foram expressos em percentagem do valor nominal.

1.4 RESULTADOS

1.4.1 Perfil Cromatográfico

O perfil cromatográfico da determinação do fluconazol encontra-se ilustrado na Figura 1, contendo os cromatogramas que registra a injeção de um extrato branco de plasma e a injeção de plasma adicionado de fluconazol.

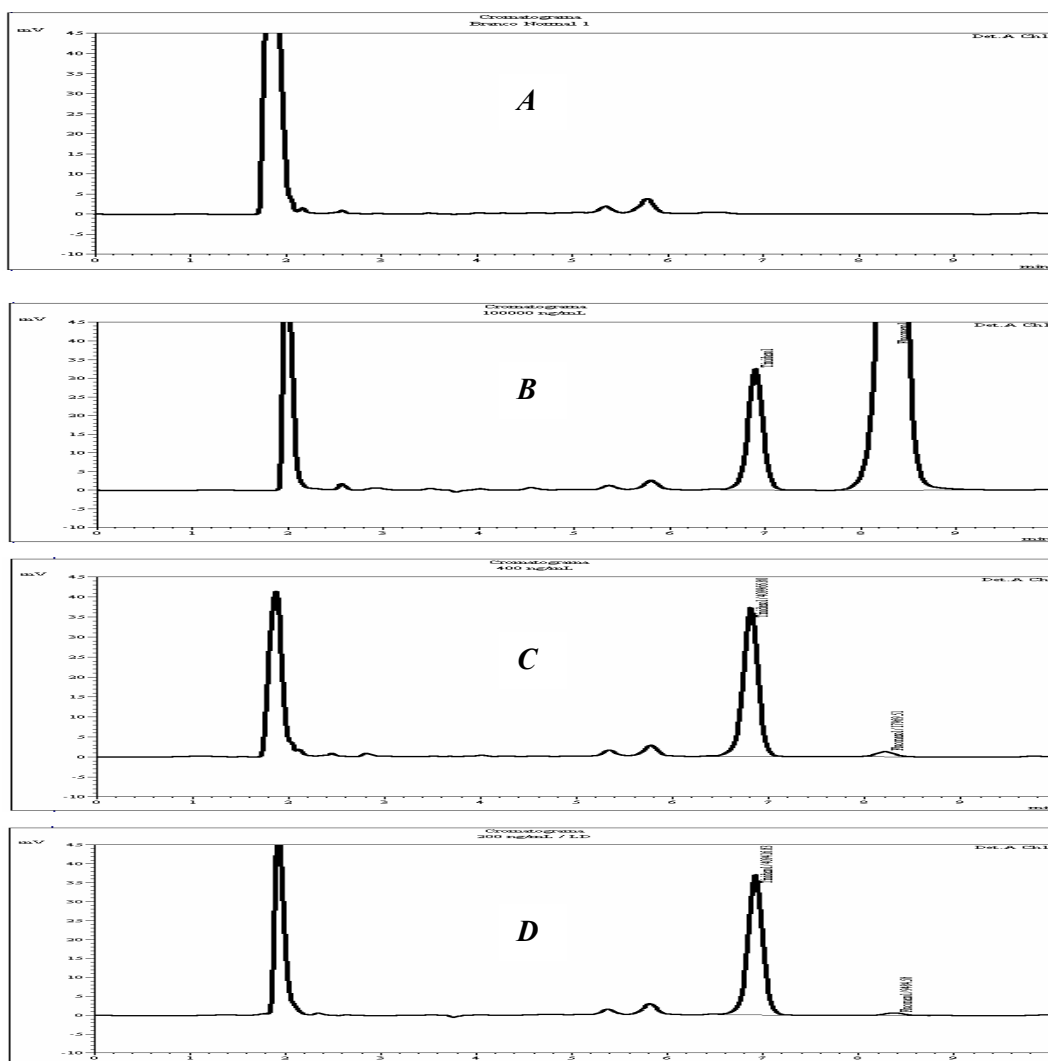


Figura 1 – Quantificação de fluconazol em plasma. Perfil cromatográfico: (A) Extrato de plasma branco; (B) Limite superior de quantificação (LSQ: 100µg/mL); (C) Limite inferior de quantificação (LIQ: 0,4µg/mL; (D) Limite de detecção (LD: 0,2µg/mL). Corrida analítica: 10 min Tempos de retenção: fluconazol (Analito: 8,4 min) e tinidazol (PI: 6,9 min).

1.4.2 Especificidade

Avaliou-se a especificidade do método bioanalítico para determinação dos antimicrobianos em matriz biológica através da injeção de extratos de plasma normal, lipêmico e hemolisado no sistema cromatográfico. Os componentes endógenos eluídos da coluna cromatográfica não interferiram na análise nas condições descritas acima, uma vez que os picos de componentes endógenos no cromatograma não foram co-eluídos com fluconazol ou com o padrão interno demonstrados nos cromatogramas da Figura 2.

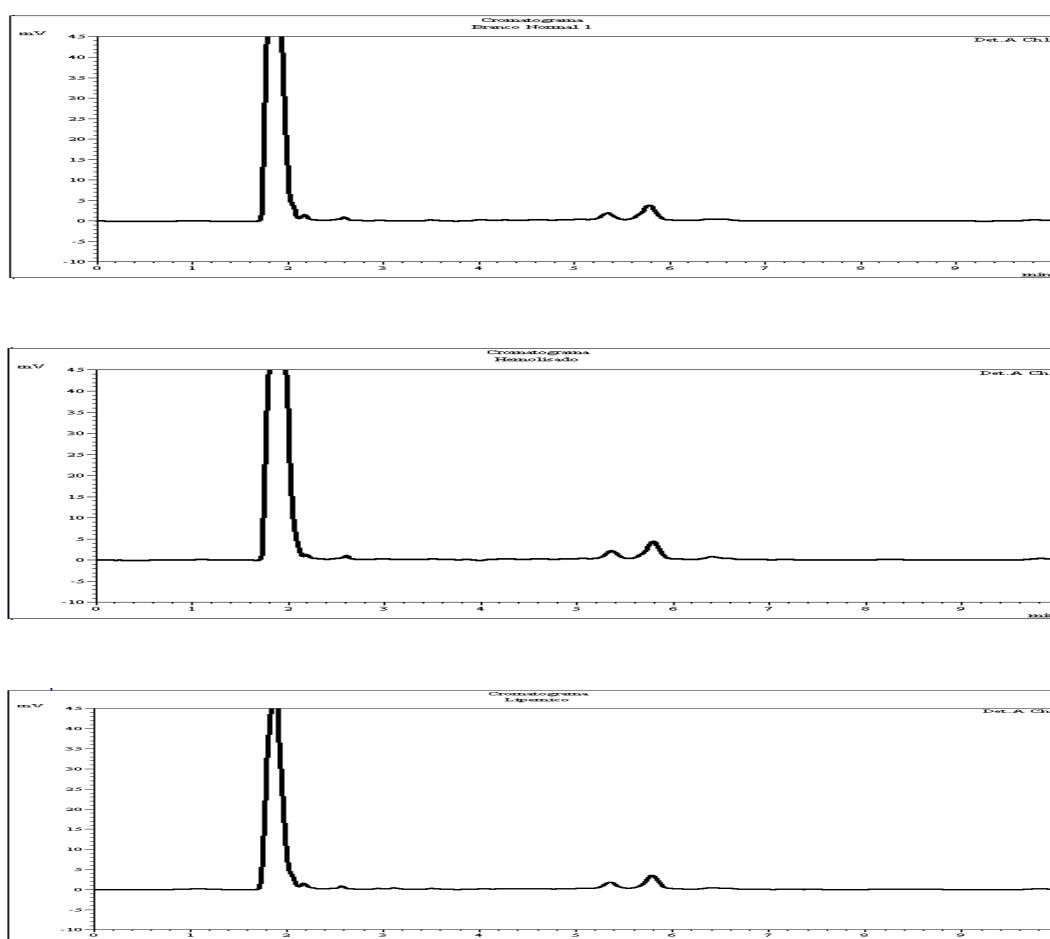


Figura 2 – Estudo da Especificidade do Método Bioanalítico. Perfil cromatográfico: (A) Extrato de plasma branco procedente de voluntário sadio; (B) Extrato de plasma branco hemolisado procedente de voluntário sadio; (C) Extrato de plasma branco lipêmico. Corrida analítica: 10 min.

1.4.3 Revalidação do Método Bioanalítico - Linearidade e Curva de Calibração

Os dados relativos à linearidade foram expressos pela média do coeficiente de correlação linear (r^2), intercepto da reta e inclinação da reta como segue na tabela 1.

Obteve-se boa linearidade conferindo ao método segurança para a determinação do fluconazol, uma vez que as concentrações plasmáticas obtidas ao término da infusão não ultrapassaram o limite superior da faixa investigada.

Evidenciou-se boa correlação linear entre razões de área e as respectivas concentrações do analito. A curva de calibração diária foi aceita a partir dos controles internos analisados em duplicata, com a rejeição de no máximo dois dos seis controles preparados, nunca sendo dois controles da mesma concentração conforme ilustrado na figura 3.

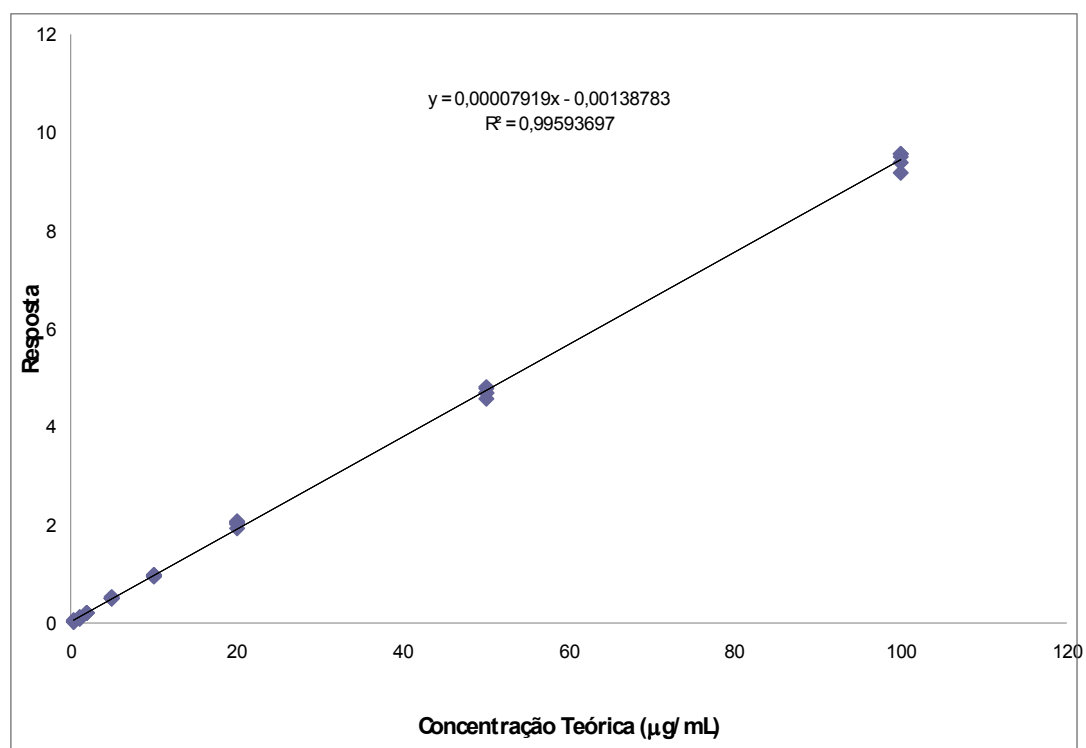


Figura 3 – Curva de calibração diária para determinação de fluconazol plasmático através de CLAE-UV. (0,4-100,0 $\mu\text{g/mL}$)

Tabela 1 - Limites de confiança para o método bioanalítico

Parâmetros	Unidade	Fluconazol
Linearidade (LIQ-LSQ)	µg/mL	0,4 - 100,0
Coeficiente de correlação (r^2)		0,9959
Limite de detecção	µg/mL	0,2
• CV	%	5,69
• Média ± DP	µg/mL	0,2 ± 0,02
LIQ	µg/mL	0,4
• CV	%	3,18
• Média ± DP	µg/mL	0,4 ± 0,01
Recuperação Absoluta	%	
• CQB/CQM/CQA	Média	76,5 (analito)
• CQB/CQM/CQA	Média	78,6 (padrão interno)
Precisão	%	
Inter-dias CQA/CQM/CQB	Média ± DP	1,49 ± 1,33
Intra-dia CQA/CQM/CQB	Média ± DP	2,27 ± 0,48
Erro sistemático (inexatidão)	Média ± DP	2,89 ± 1,23
Ciclo de congelamento	%	
• Ciclo 1, 2, 3	Média ± DP	6,47 ± 2,07

Abreviaturas: DP: desvio padrão da média; CV: coeficiente de variação; LIQ: limite inferior de quantificação; LSQ: limite superior de quantificação; CQA: controle de qualidade alto; CQM: controle de qualidade médio; CQB: controle de qualidade baixo.

1.4.4 Limite de quantificação e limite de detecção

Os resultados obtidos para os limites de detecção (LD), coeficiente de variação, médias e desvio padrão encontram-se descritos na tabela 1.

1.4.5 Precisão, exatidão e recuperação.

Em relação aos estudos de precisão e exatidão intra- e interdias, o método apresentou coeficiente de variação inferior aos limites indicados na legislação, tabela 1. A precisão do método analítico foi expressa através do coeficiente de variação percentual e a exatidão foi avaliada em função da “inexatidão percentual”. Além disto, os métodos apresentaram boa recuperação relativa e absoluta para Fluconazol. A curva de calibração evidenciou boa linearidade (r^2 : 0,9959), figura 3.

1.4.6 Estabilidade do Fluconazol

Para o estudo de estabilidade do fluconazol em fluídos biológicos adotou-se como critério da aceitação variação inferior a 15%, para todas as concentrações avaliadas. No estudo de estabilidade após ciclos de congelamento de descongelamento, verificou-se que o fluconazol se manteve estável por no mínimo três ciclos congelamento/descongelamento, para três concentrações (alta média e baixa) em triplicata com adequado coeficiente de variação, tabela 1.

1.5 DISCUSSÃO

Reportaram-se anteriormente na literatura diversos métodos para determinação de fluconazol através de CLAE-UV no plasma (COCIGLIO *et al.*, 1996; FLORES-MURRIETA *et al.*, 1994; WATTANANAT; WIYADA, 2006) ou no soro (EGLE *et al.*, 2004; WALLACE *et al.*, 1992; NG *et al.*, 1996), no liquor (WALLACE *et al.*, 1992), ou ainda na saliva (KOKS *et al.*, 1994). Uma série de desvantagens foi registrada nesses estudos, uma vez que a injeção direta de plasma diluído foi reportada, com comprometimento da instrumentação analítica em médio prazo (COCIGLIO *et al.*, 1996; EGLE *et al.*, 2004). Adicionalmente, os extratos impuros de matrizes biológicas foram obtidos pela precipitação de proteínas do plasma seguida da injeção desses extratos no CLAE-UV (NG *et al.*, 1996). Os principais problemas apontados nesses métodos foram o consumo de grande número de pré-colunas requeridas para proteger a coluna analítica de alto custo, a redução da vida útil da coluna analítica em decorrência de compostos endógenos injetados em grande quantidade no sistema cromatográfico, entupimento do auto-injetor e da tubulação pelo aparecimento de vazamentos decorrentes do aumento da pressão conforme reportado por Cociglio *et al.* (1996).

Por outro lado, o procedimento empregando a extração em fase sólida para a purificação de amostras de plasma e quantificação do fluconazol foi anteriormente reportado (FLORES-MURRIETA *et al.*, 1994; INAGAKI *et al.*, 1992; WATTANANAT; WIYADA, 2006). Recentemente, Santos *et al.* (2010), reportaram a extração líquido-líquido do fluconazol plasmático com diclorometano, em meio alcalino, considerado procedimento simples e reproduzível, com boa seletividade e menor custeio quando comparado ao procedimento de extração em fase sólida. Sabe-se que a seletividade do procedimento de extração líquido-líquido utilizando a mistura de solventes orgânicos é maior do que aquela obtida pela precipitação das proteínas plasmáticas com metanol ou com acetonitrila. Esse método mostrou ainda superioridade quando comparado ao procedimento descrito por Koks *et al.* (1994), uma vez que extração líquido-líquido única com dietileter e diclorometano (70:30, v/v) foi empregada ao invés da dupla extração reportada por esses autores. Desta forma, o método bioanalítico revalidado apresentou-se simples, rápido e seletivo para a determinação de fluconazol em plasma por CLAE-UV.

Ressalta-se que o limite inferior de quantificação recentemente reportado por Santos *et al.* (2010), foi duplicado no presente estudo em decorrência do aumento da tomada de ensaio de plasma, bem como do volume de extrato purificado injetado no sistema analítico.

Relativamente às condições cromatográficas para a determinação de fluconazol no plasma, a separação utilizada no presente método realizou-se em coluna CN e fase móvel binária, confirmando os resultados reportados recentemente por Santos *et al.* (2010) pela utilização de fase móvel binária contendo acetonitrila e água purificada ao invés de tampão reportada anteriormente (FLORES-MURRIETA *et al.*, 1994; WATTANANAT; WIYADA, 2006).

Considerando os parâmetros de validação do método analítico, a linearidade obtida no presente estudo confirma os dados recentemente reportados por Santos *et al.* (2010) evidenciando faixa de trabalho mais adequada relativamente aos valores relatados anteriormente (COCIGLIO *et al.*, 1996; EGGLE *et al.*, 2004; FLORES-MURRIETA *et al.*, 1994; KOKS *et al.*, 1994; WALLACE *et al.*, 1992; WATTANANAT; WIYADA, 2006). Tal resultado obtido no presente estudo se deve não só à boa estabilidade do fármaco nos extratos de plasma, mas também à alta sensibilidade obtida em consequência da ótima recuperação do analito no extrato purificado.

A escolha do comprimento de onda de 260nm ao invés de 210nm (SANTOS *et al.*, 2010) para a quantificação do fluconazol em matrizes biológicas proposto por Egle *et al.* (2004), Flores-Murrieta *et al.* (1994), Wattananat e Wiyada (2006) e Wallace *et al.* (1992) é consequência da precipitação de proteínas plasmáticas, injeção direta de plasma diluído ou ainda pela utilização de solventes de alta polaridade na extração líquido-líquido que comprometem a especificidade do método pelo aparecimento de uma série de interferentes (componentes endógenos) na corrida analítica em 210nm, afetando por consequência a qualidade do cromatograma neste comprimento de onda (SANTOS *et al.*, 2010).

Uma vez que não se registrou a co-eluição de outros componentes com o fluconazol ou com o tinidazol, padrão interno, a seletividade e a especificidade obtidas para o método bioanalítico no presente estudo foram garantidas pela preparação de extratos purificados e análise em CLAE-UV 210 nm.

1.6 CONCLUSÃO

O método bioanalítico proposto apresenta baixo custo, simplicidade e facilidade de execução, vantagem em termos de linearidade, recuperação do analito, seletividade e sensibilidade, aceitável precisão e exatidão, além de boa estabilidade. Portanto, o método bioanalítico em CLAE-UV é adequado para o monitoramento plasmático de fluconazol e aplicação no monitoramento terapêutico requerido no seguimento do paciente queimado para o estudo farmacocinético exigido no ajuste de dose para controle da infecção fúngica sistêmica.

Capítulo 2

Monitoramento Plasmático e Farmacocinética do Fluconazol em Pacientes Queimados

2.1 INTRODUÇÃO

Em função da carência de agentes seguros e eficazes no tratamento de infecções fúngicas graves, iniciou-se em 1978 na Inglaterra, um programa para busca de novo fármaco antifúngico para o controle das infecções sistêmicas. Dentre as classes de antifúngicos destacam-se: a) inibidores da membrana celular do fungo, i.é, os derivados poliênicos como a anfotericina B e os derivados azólicos como o fluconazol, b) inibidores do DNA com a 5-flucitocina, c) inibidores da síntese da parede celular como a caspofungina (RICHARDSON *et al.*, 1990).

Considerando-se, os azóis de forma geral, inibidores da síntese de ergosterol, um dos componentes da membrana fúngica, registrou-se alta lipofilicidade, além de vulnerabilidade metabólica, resultando em baixa biodisponibilidade oral, grande volume aparente de distribuição, concentrações sangüíneas baixas e alta ligação às proteínas plasmáticas. Em decorrência disso, as características ideais requeridas para a nova molécula seriam a eficácia pelas vias peroral e intravascular, a segurança e atividade de amplo espectro contra fungos, possibilitando sua utilização em pacientes com alto risco portadores de infecções fúngicas sistêmicas; além disso, para as infecções de menor gravidade como candidíase vaginal e dermatomicoses com grande desconforto aos pacientes, esses novo derivado também poderia ser utilizado (RICHARDSON *et al.*, 1990).

Desta forma, em 1985 sintetizou-se o fluconazol (2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis (1H-1,2,4-triazol-1-il)-2-propanol), ilustrado na figura 4, que apresentou excelente atividade antifúngica em modelos animais, além de adequada solubilidade em água, permitindo sua administração intravascular. Realizaram-se os ensaios pré-clínicos para a nova molécula com sucesso e grande perspectiva nos ensaios clínicos subseqüentes (RICHARDSON *et al.*, 1990).

Este antifúngico triazólico representa a segunda geração de compostos azólicos tem sido utilizado com sucesso, desde a sua introdução na terapêutica a partir do registro obtido na década de 90, como agente preferencial no combate a infecções fúngicas sistêmicas (MICROMEDEX, 2010).

Adicionalmente é utilizado com sucesso no tratamento das infecções das mucosas causadas por *Candida albicans*, fungo patogênico encontrado em pacientes imunossuprimidos de longa hospitalização. O fluconazol também tem se mostrado eficaz no tratamento de meningite criptocócica e de outras infecções fúngicas sistêmicas (GOA *et al.*, 1995).

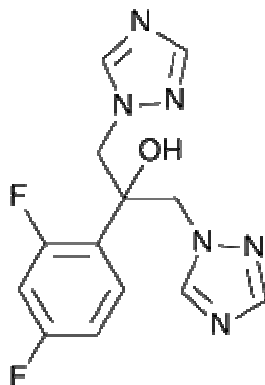


Figura 4 - Estrutura química do fluconazol (2-(2,4-difluorofenil)-1,3-bis (1H-1,2,4-triazol-1-il)-2-propanol), $C_{13}H_{12}F_2N_6O$, PM 306,3 D. (MICROMEDEX, 2010).

A ação fungistática do fluconazol, derivado triazólico é consequência da inibição da enzima 14- α -desmetilase do sistema microssomal hepático, e bloqueio da biosíntese do ergosterol, acarretando o acúmulo de 14- α -metilesteróis e aumento da permeabilidade da membrana celular com a perda de elementos essenciais ao fungo e dificuldade na captação de moléculas precursoras. Adicionalmente, apresenta alta afinidade pelo CYP fúngico e baixa afinidade pelo CYP de mamíferos, além de serem inibidores mais específicos que os derivados de azóis (RICHARDSON *et al.*, 1990; MICROMEDEX, 2010).

Em decorrência do aumento dramático da incidência e da prevalência de infecções fúngicas superficial ou sistêmica, pela utilização de fármacos imunossupressores em pacientes transplantados ou portadores de câncer, além do aumento da incidência da doença da imunodeficiência adquirida, Brammer *et al.* (1990) realizaram ensaios clínicos com fluconazol em pacientes jovens e em idosos com função renal preservada e disfunção renal dialítica. Adicionalmente, esses autores investigaram a farmacocinética desse novo antifúngico, pelo estudo da transferência e penetração desse agente nos tecidos infectados. Uma vez que a anfotericina B associada à flucitocina não deveriam ser utilizadas pela ineficácia no tratamento de meningite fúngica pela dificuldade de travessia da barreira, os estudos de penetração do fluconazol através da barreira

hematoencefálica se mostraram de alta relevância no tratamento da meningite fúngica (BRAMMER *et al.*, 1990).

Finalmente, com relação ao seguimento de pacientes queimados em tratamento da infecção fúngica sistêmica, a literatura é escassa uma vez que está previsto a farmacoterapia de baixa dosagem diária nesses pacientes, e o regime posológico inicial recomendado é de 200mg duas vezes ao dia. Reportou-se anteriormente larga faixa de concentração plasmática para o fluconazol no decurso do tempo em decorrência da alta variabilidade da farmacocinética desse agente nos pacientes queimados (RAYATT *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2010).

2.2 OBJETIVO

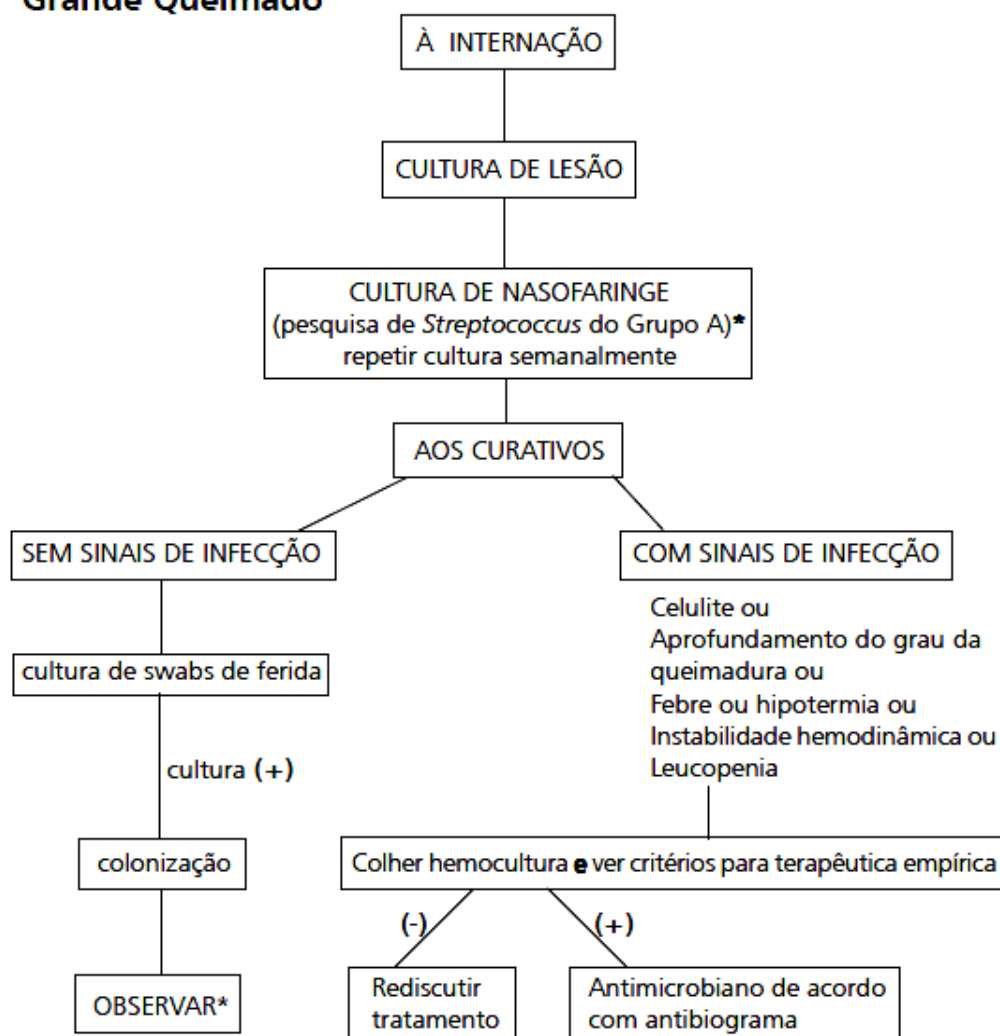
Realizar o monitoramento das concentrações plasmáticas e estudo farmacocinético do fluconazol em pacientes com infecção fúngica após queimadura.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Local do Estudo

O estudo foi desenvolvido na Unidade de Terapia Intensiva, Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, localizado no 8º Andar do Instituto Central, na região noroeste da cidade de São Paulo, Brasil. A UTI de Queimados obedece a um protocolo de uso de antimicrobianos instituído pela CCIH (Comissão de Controle de Infecção Hospitalar) e disposto no fluxograma 3.

Grande Queimado

* Pacientes com culturas de vigilância positivas para *S. pyogenes*:

Iniciar penicilina G cristalina 200.000 - 300.000 unidades/kg divididas com intervalo de 4 horas **por 4 dias**. Manter o paciente em isolamento durante esse período. Recomendamos adiar a enxertia até término do curso de penicilina.

Pacientes com infecção por *S. pyogenes*:

Primeira escolha: penicilina G cristalina 200.000 - 300.000 unidades/kg divididas com intervalo de 4 horas **por 10 a 14 dias**. Manter o paciente em isolamento de contato durante esse período. Recomendamos adiar a enxertia até término do curso de penicilina.

Fluxograma 3 – Rotina de coleta de cultura e terapia antimicrobiana HCFMUSP para pacientes grande queimados. **Fonte:** HCFMUSP, 2007-2008

2.3.2 Considerações Éticas

O protocolo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do da FCF-USP e do HCFMUSP (Anexos I e II).

2.3.2.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi previamente aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa das Instituições envolvidas no presente estudo (Anexo III). Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram incluídos no estudo. O termo de consentimento assinado pelo paciente/ou seu representante legal, e pelo clínico responsável foi arquivado, ficando sob a guarda desse último.

2.3.2.2 Critérios de Elegibilidade dos Pacientes

Foram incluídos todos os pacientes internados na unidade de queimados do Hospital no período de maio a novembro de 2010 que preencheram os critérios de inclusão e exclusão, perfazendo um total de 12 pacientes. Os mesmos foram monitorados durante o tratamento realizado na UTI de Queimados. O controle terapêutico foi efetuado em todos os pacientes investigados e a modelagem farmacocinética foi aplicada para suporte ao ajuste de dose.

2.3.2.3. Critérios de inclusão

1. Pacientes do sexo masculino ou feminino, adultos, idade superior a 18 anos.
2. Sinais e sintomas clínicos compatíveis com infecção em queimados, que tenham a necessidade de introdução de um ou mais antimicrobiano sistêmico; paciente apresentando no mínimo dois dos seguintes sinais e sintomas:
 - Febre (>38°C) ou hipotermia (temperatura axilar /central <35°C),
 - Frequência cardíaca acima de 90bpm,
 - Frequência respiratória acima de 20 incursões respiratórias por minuto,
 - Condição mental alterada,
 - Íleo adinâmico ou com obstrução,
 - Intolerância à glicose,
 - Contagem de leucócitos periféricos totais elevada > 10.000 células/mm³,

- Aumento parcial da espessura da lesão ou necrose total,
- Mudança na coloração da lesão para o vermelho escuro, marrom ou violáceo,
- Descoloração hemorrágica de tecido subescara, degeneração de tecido de granulação ou formação de nova escara,
- Edema em pele não queimada à margem da ferida,
- Pigmento verde visível em gordura subcutânea,
- Lesão nodular nevrótica em pele não queimada,
- Separação rápida, não esperada da escara,
- Lesões vesiculares na cicatriz ou queimadura com cicatrização parcial da espessura, e finalmente,
- Suspeita de infecção a critério do médico responsável.

3. Obtenção do consentimento livre e esclarecido (TCLE). Caso o paciente não possa fornecer o termo, um representante legal deve assinar o TCLE, modelo anexado no Apêndice, de acordo com os requisitos da Instituição, e determinação do Comitê de Ética em Pesquisa local.

2.3.2.4 Critérios de exclusão

1. Paciente gravemente neutropênico (contagem absoluta de neutrófilos $< 500/\text{mm}^3$) no período de estudo devido à quimioterapia prévia ou planejada ou ainda no paciente com HIV apresentando contagem de CD4 < 200 nos últimos seis meses,
2. Grávidas e nutrízes,
3. Hipersensibilidade conhecida ou intolerância aos medicamentos em estudo ou aos excipientes de sua formulação.

2.3.3 CASUÍSTICA

O estudo realizado refere-se ao monitoramento terapêutico de 12 pacientes queimados com infecção fúngica sistêmica que receberam infusão intermitente de fluconazol. Os pacientes foram alocados de acordo com a ordem (seqüencial crescente) de inclusão no estudo. As características individuais dos pacientes investigados são descritas no quadro 12.

Quadro 12 - Características dos pacientes investigados, dados individuais (n = 12).

Nº Alocação	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	SCQ (%)	Agente	Lesão Inalatória
#1	F	28	60	70	T	-
#4	M	43	102	18	E	-
#5	F	55	70	10	T	-
#12	M	22	70	75	T	-
#18	F	35	60	52,5	T	+
#19	M	36	70	8	T	-
#21	M	67	70	36	T	-
#25	M	47	70	28	T	+
#28	M	32	70	33,5	E	-
#30	M	90	63,5	8,5	T	-
#41	F	70	70	45	T	+
#42	M	55	70	35	T	+

Abreviações: M: masculino; F: feminino; T: térmico; E: elétrico; SCQ: superfície corporal queimada; lesão inalatória (+) presença, (-) ausência

A função renal foi avaliada através da creatinina sérica (SCr: 0,6 e 1,4 mg/dL valor de referência, faixa de normalidade); o clearance de creatinina (mL/min) foi estimado a partir da creatinina sérica, equação abaixo referida, utilizando o nomograma de Cockcroft e Gault (COCKCROFT; GAULT, 1976) e calculado através de programa *Clearance calculator* disponibilizado (MICROMEDEX, 2010).

$$\text{Clearance creatinina} = \frac{(140 - \text{idade}) \times \text{Peso (kg)}}{72 \times \text{Cr (mg / dL)}}$$

No caso de mulheres, empregou-se a mesma equação com fator de correção de 0,85 em função de uma menor produção de creatinina decorrente da massa muscular reduzida.

Como estes pacientes permanecem hospitalizados por longo período, e considerando-se a variabilidade na função renal, a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina foram monitorados em cada coleta seriada de amostras de sangue durante todo seguimento farmacoterapêutico relativo ao fluconazol.

No caso específico do paciente queimado, uma vez que ocorre aumento do catabolismo e perda de massa muscular, a creatinina sérica, e o *clearance* de creatinina, não refletem a função renal do paciente; desta forma, a falência renal deve ser considerada para o paciente queimado na vigência procedimento de diálise.

2.3.4. PROTOCOLO CLÍNICO

Investigaram-se os pacientes queimados portadores sepse que foram admitidos na Unidade no período de estudo, que receberam doses iniciais de fluconazol pela via intravenosa 100 a 400mg, uma vez ao dia, segundo o protocolo recomendado pela CCIH do HCFMUSP, fluxogramas 1 e 2. Estas doses foram ajustadas “em tempo real” de acordo com o resultado do monitoramento terapêutico realizado através do decaimento das concentrações plasmáticas e modelagem farmacocinética.

Durante o seguimento farmacoterapêutico do paciente na UTI, a critério do Clínico realizaram-se em cada período cerca de cinco coletas seriadas de sangue (2 mL, cada) através de cateter venoso para quantificação das concentrações plasmáticas de cada antimicrobiano no intervalo de dose. As amostras de sangue foram coletadas em tubos de hemograma contendo EDTA sódico, estado de equilíbrio na fase de eliminação (cinco meias-vidas de tratamento). As amostras de sangue identificadas com etiquetas com código de barra (serviço, registro hospitalar, convenio, leito e nome do paciente/data de nascimento); incluíram-se nessas etiquetas as informações de data e horário da coleta realizada. As coletas foram realizadas exclusivamente pela equipe clínica na UTI de Queimados. O volume de sangue coletado na seringa foi transferido para tubos contendo EDTA sódico (BD, São Paulo, SP, Brasil), seguido de homogeneização, três vezes por inversão. Durante as coletas as amostras foram mantidas em geladeira e ao término, os tubos e a prescrição informatizada foram encaminhados para a FCF USP para a realização das etapas analítica e estatística.

Procedeu-se a entrada e registro do material procedente da UTI no laboratório FCF USP. O sangue foi centrifugado a 2800g por 30 minutos, o plasma separado e as amostras devidamente identificadas acondicionadas em estante contendo a identificação do paciente (número de alocação: #1, #4, #5, #12, #18, #19, #21, #25, #28, #30, #41, #42) e mantidas em congelador (80^oC negativos) até o ensaio.

2.3.5. ETAPA ANALÍTICA

A quantificação do fluconazol nas amostras de plasma coletadas dos pacientes utilizou o método bioanalítico de quantificação de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV), revalidado anteriormente, Capítulo 1.

2.3.5.1. Controle Terapêutico

A administração de fluconazol através de infusões múltiplas gera o estado de equilíbrio também conhecido por platô. Após cada administração da medicação, tem-se o pico de concentração plasmática ao término da infusão (concentração plasmática máxima) e a concentração plasmática mínima atingida (vale) que ocorre imediatamente antes da infusão subsequente.

Por outro lado, a concentração máxima atingida pela infusão de fluconazol é proporcional a dose administrada, enquanto que a concentração plasmática mínima é proporcional ao acúmulo de doses no platô.

Desta forma, o controle terapêutico do fluconazol prevê que a concentração mínima do antifúngico circulante deva ser superior a 11µg/mL, considerada a concentração mínima eficaz para o controle das infecções sistêmicas por *Candida albicans*. Assim, procede-se então à coleta única de sangue no momento imediatamente antes da dose subsequente para o monitoramento do vale de concentração plasmática do fluconazol e ajuste de dose, quando necessário.

Entretanto, o ajuste de dose para o fluconazol mostrou-se insatisfatório com base no parâmetro concentração plasmática de vale, necessitando do suporte adicional fornecido pelo estudo farmacocinético. A modelagem farmacocinética, a partir da coleta de amostras de sangue seriadas realizada em momentos estratégicos, fornece ao Clínico dados referentes aos processos de distribuição e eliminação com embasamento para alteração da posologia empírica para terapia dose ajustada.

2.3.5.2. Farmacocinética

Como a farmacocinética do fluconazol é linear na faixa de dose terapêutica recomendada, aplicou-se o modelo aberto de um compartimento, a partir da transformação logarítmica das concentrações plasmáticas (C) obtidas em função do tempo (T) após administração intravenosa do fármaco em regime de doses

múltiplas. Utilizou-se o *software PK Solutions v.2.0 Noncompartmental Analysis PK Solutions 2.0* (Summit, USA) para a modelagem farmacocinética.

Estimaram-se as constantes farmacocinéticas dependentes (constante de velocidade de eliminação e meia vida biológica) e independentes (depuração plasmática e volume aparente de distribuição) do modelo compartimental utilizado a partir da área sob a curva integrada no intervalo de dose, conforme descrito no quadro 13.

A distribuição foi estimada a partir do volume aparente que expressa a extensão da distribuição, uma vez que no modelo utilizado a velocidade do processo *alfa* não foi determinada. A meia-vida biológica estimada na fase terminal da curva de decaimento é o tempo necessário para a redução da concentração plasmática em 50% na fase de eliminação. A constante da velocidade de eliminação é definida a partir da inclinação da reta de eliminação, e a equação abaixo que permite correlacionar esses dois parâmetros do processo de eliminação. Após administração intravascular de cada antimicrobiano investigado, a depuração plasmática foi estimada a partir da razão entre a dose infundida e a área sobre a curva integrada no intervalo de dose considerando-se as concentrações plasmáticas obtidas no estado de equilíbrio. O volume aparente de distribuição foi estimado através da razão entre a depuração plasmática e a constante de velocidade de eliminação.

Quadro 13 - Parâmetros farmacocinéticos após infusão múltipla no estado de equilíbrio.

Descrição do Parâmetro	Representação (unidade)	Equação
Constante de infusão	K_0 (mg/hora)	Dose/Tempo de infusão
Constante de eliminação	K_{el} (h^{-1})	$(\ln C_1 - \ln C_2) / (T_2 - T_1)$
Meia-vida de beta	$t(1/2)_\beta$ (h)	$0,693 / K_{el}$
Área sob a curva no steady state	ASC^{SS}_τ ($\mu g \cdot h / mL$)	Trapezoides (integração ponto a ponto do intervalo de dose)
Depuração plasmática	CL_τ ($mL / min / kg$)	$Dose / ASC^{SS}_\tau$
Volume aparente de distribuição no steady state	V_d^{SS} (L / kg)	$Dose / (K_{el} \cdot ASC^{SS}_\tau)$

Fonte: PK Solutions 2.0 Noncompartmental Pharmacokinetics Data Analysis, Summit, USA

2.3.6. ETAPA ESTATÍSTICA

2.3.6.1 Modelagem Farmacocinética

A modelagem farmacocinética foi realizada através da aplicação do *software PK Solutions v.2.0 Noncompartmental Analysis PK Solutions 2.0* (Summit, USA) aos pares de dados concentração *versus* tempo para estimativa dos parâmetros cinéticos modelo dependentes e modelo independentes.

2.3.6.2 Tratamento Estatístico

O tratamento estatístico dos resultados obtidos ou estimados a partir de aplicação de *softwares* foi realizado através da aplicação de *softwares Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA)* e *GraphPad InStat for Windows versão 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)*. Na estatística descritiva, os dados foram expressos através das médias, desvio padrão, faixa de variação IC95% (intervalo de confiança 95% delimitado pelos limites inferior e superior) bem como o valor mínimo e máximo obtidos para todos os parâmetros estudados na população de pacientes. Os parâmetros farmacocinéticos do fluconazol foram expressos através das medianas.

2.4 RESULTADOS

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos; as características individuais dos pacientes investigados são descritos no quadro 12. Registrou-se incidência de lesão inalatória nos acidentes de origem térmica em 40% dos pacientes investigados (4/10). A caracterização da população de pacientes queimados encontra-se descrita na tabela 2 através de dados antropométricos (sexo, idade, peso) e a superfície corporal queimada, agente da queimadura e presença ou não de lesão inalatória.

Tabela 2 - Caracterização da população de pacientes queimados investigados

Parâmetro	Sexo M/F	Idade (anos)	Peso (kg)	SCQ (%)	Agente T/E	Lesão Inalatória +/-
Média	8/4	46,8	69,9	38,8	10/2	4/8
DP	NAP	20,6	11,5	24,0	NAP	NAP
Vmín	NAP	22	60	8	NAP	NAP
Vmáx	NAP	90	102	75	NAP	NAP
LI IC 95%	NAP	39,5	65,8	30,3	NAP	NAP
LS IC 95%	NAP	54,1	74,0	47,2	NAP	NAP

Estatística: *GraphPad Prism 4* para estatística descritiva.

Abreviaturas: NAP: Não Aplicável; M: masculino; F: feminino; SCQ: superfície corporal queimada; T: térmico; E: elétrico; DP: desvio padrão da média; LI IC95%: limite inferior do intervalo de confiança 95%; LS IC95%: limite superior do intervalo de confiança 95%; Vmin: valor mínimo; Vmáx: valor máximo; Lesão inalatória: (+) presença, (-) ausência.

Em decorrência da infecção fúngica na fase tardia de internação do paciente queimado na UTI, realizou-se o seguimento farmacoterapêutico em 12 pacientes recebendo fluconazol sistêmico. Durante o período de realização do estudo realizou-se o seguimento de 12 pacientes, no atendimento a cada solicitação de exame efetuada pelo médico, totalizando 31 laudos emitidos para o fluconazol com finalidade de monitoramento plasmático e estudo farmacocinético. Em cada laudo de resultado de exame registrou-se a concentração plasmática de vale, bem como os parâmetros farmacocinéticos obtidos para o paciente. Os valores de referência para esses parâmetros foram incluídos para apoio ao Clínico na interpretação dos resultados após coleta de amostras sanguíneas do paciente em cada seguimento.

A alteração do regime posológico prescrito inicialmente para o fluconazol (dose empírica de 400mg/dia, no regime de 200mg de 12/12hs) foi exigida em 58%

das prescrições, sendo 26% relativas à redução da dose e 32% pelo aumento da dose conforme indicado na figura 5.

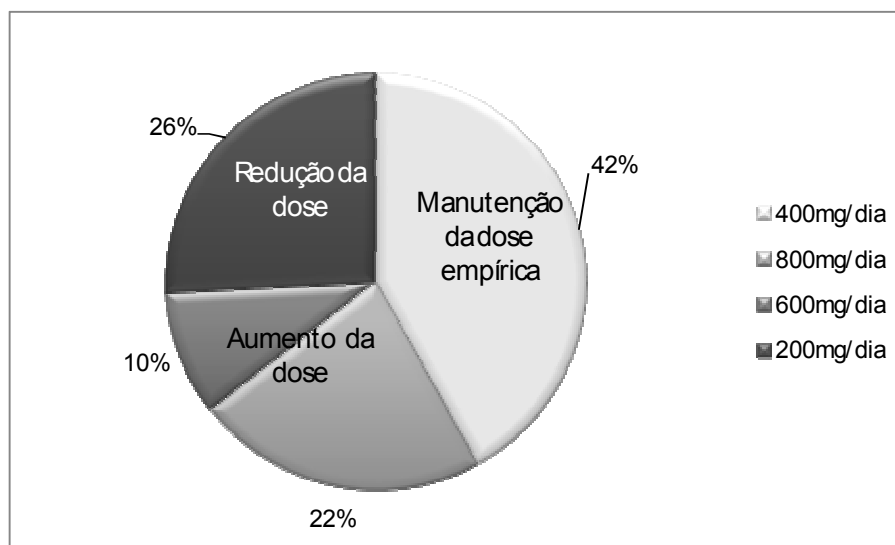


Figura 5 - Alteração do regime de dose empírica de Fluconazol (400mg ao dia, sendo 200mg duas vezes ao dia) no total de 31 seguimentos realizados em 12 pacientes.

A terapia dose ajustada foi requerida para o controle da infecção fúngica nos queimados pelo aumento da dose diária do fluconazol para 600mg/dia (200mg 8/8hs) e para 800mg/dia (200mg 6/6hs), respectivamente em 10% e 22% dos seguimentos realizados. Entretanto, a dose diária foi reduzida para 200mg, 1x ao dia nos casos de insuficiência renal dialítica em 26% dos seguimentos realizados. O seguimento dos 12 pacientes que receberam o agente antifúngico é referido na tabela 3. Adicionalmente durante o seguimento, sete pacientes apresentaram função renal normal, e outros cinco pacientes iniciaram o tratamento com o antifúngico já vigência de disfunção renal dialítica. Dentre os pacientes com função renal preservada, apenas o paciente #18 evoluiu para insuficiência renal dialítica. A estatística descritiva relativa ao regime de dose e monitoramento da concentração plasmática de vale para o fluconazol na população de pacientes portadores de infecção fúngica encontra-se na tabela 3.

Tabela 3 - Regime de dose e Controle Terapêutico de Fluconazol nos Pacientes

Alocação	CLcr mL/min	Dose/dia mg	Dose normalizada mg/kg/dia	Dose fracionada mg	τ horas	Vale $\mu\text{g/mL}$
#1	18,6	400	6,7	200	12/12	6,4
	-	400	6,7	200	12/12	20,6
	-	400	6,7	200	12/12	21,3
	-	400	6,7	200	12/12	12,2
	16,8	400	6,7	200	12/12	13,8
#4	40,8	400	3,9	200	12/12	0,5
	30,6	800	7,8	200	6/6	12,0
	20,4	800	7,8	200	6/6	24,0
#5	63,0	400	5,7	200	12/12	0,5
	35,0	400	5,7	200	12/12	15,0
#12	21,0	800	11,4	400	12/12	10,2
	28,0	800	11,4	400	12/12	4,5
	21,0	800	11,4	400	12/12	17,0
#18	30,0	400	6,7	200	12/12	8,0
	36,0	600	10,0	200	8/8	9,1
	6,0	600	10,0	200	8/8	50,0
#19	21,0	400	5,7	200	12/12	5,9
	14,0	600	8,6	200	8/8	20,0
#21	7,0	400	5,7	200	12/12	24,0
	7,0	200	2,9	200	24/24	13,9
	7,0	200	2,9	200	24/24	8,2
	21,0	200	2,9	200	24/24	4,5
#25	14,0	400	5,7	200	12/12	0,5
#28	-	800	11,4	400	12/12	19,1
	14,0	800	11,4	400	12/12	24,5
#30	6,4	200	3,1	200	24/24	6,5
	-	400	6,3	200	12/12	24,3
	6,4	200	3,1	200	24/24	11,5
#41	-	200	2,9	200	24/24	10,5
#42	180,0	200	2,9	200	24/24	ND
	8,4	200	2,9	200	24/24	4,0
Média	26,93	458,1	6,57	232,3	NAP	13,0
DP	34,62	220,3	2,98	74,8	NAP	10,3
LI IC 95%	14,73	380,5	5,52	205,9	NAP	9,4
LS IC 95%	39,12	535,6	7,62	258,6	NAP	16,6
CV%	128,55	48,09	45,31	32,20	NAP	79,36

Estatística: GraphPad Prism 4 para estatística descritiva, n= 12 pacientes em 31 seguimentos.

Abreviaturas: NAP: Não Aplicável; CLcr: Clearance da creatinina sérica; τ : intervalo entre doses; ND: concentração não detectada; DP: desvio padrão da média; LI IC95%: limite inferior do intervalo de confiança 95%; LS IC95%: limite superior do intervalo de confiança 95%; CV%: coeficiente de variação.

Desta forma, para fins de distribuição dos pacientes em grupos para tratamento estatístico, considerou-se a função renal dos pacientes com base na presença ou não de disfunção renal dialítica. A estatística descritiva relativa à

farmacocinética do fluconazol nas populações de pacientes com função renal normal e com insuficiência renal dialítica encontra-se nas tabelas 4, 5, 6 e 7.

Conforme indicado na tabela 4, a meia vida biológica obtida frente aos valores de referência se mostrou reduzida nos dois grupos de pacientes queimados. A variabilidade do parâmetro foi alta, sendo de 63,5% nos seguimentos de pacientes com função renal preservada e superior (80,5%) nos seguimentos de pacientes com função renal dialítica.

Tabela 4 - Meia vida biológica do fluconazol, n= 31 seguimentos

Valor de referência: 27 a 37 horas

Fonte: Micromedex, 2010

Parâmetro	FRN (n=17)	Díálise (n=14)
Mediana	8,1	8,3
Média/DP	9,1+/-5,8	10,6+/-8,6
Vmín	1,5	0,7
Vmáx	21,1	25
LI IC 95%	6,3	6,1
LS IC 95%	11,8	15,1
CV%	63,5	80,5

Estatística: GraphPad InStat 3.0 e GraphPad Prism 4 para estatística descritiva. **Abreviaturas:** FRN: função renal normal; DP: desvio padrão da média; LI IC95%: limite inferior do intervalo de confiança 95%; LS IC95%: limite superior do intervalo de confiança 95%; Vmín: valor mínimo; Vmáx: valor máximo; CV%: coeficiente de variação; CV%: coeficiente de variação.

Conforme referido na tabela 5, a depuração plasmática obtida se mostrou dentro dos valores de referência para os dois grupos de pacientes queimados. A variabilidade do parâmetro foi alta, sendo de 50,3% nos seguimentos de pacientes com função renal preservada e nos seguimentos de pacientes com função renal dialítica a variabilidade se mostrou muito elevada (144,7%).

Tabela 5 - Depuração plasmática em 31 seguimentos

Valor de referência: 0,27 a 0,63 mL/min.kg

Fonte: Micromedex, 2010

Parâmetro	FRN (n=17)	Diálise (n=14)
Mediana	0,3	0,3
Média	0,3	0,6
DP	0,1	0,8
Vmín	0,1	0,1
Vmáx	0,6	2,6
LI IC 95%	0,2	0,1
LS IC 95%	0,3	1,0
CV%	50,6	144,7

Estatística: GraphPad Prism 4 para estatística descritiva. **Abreviaturas:** FR: função renal; DP: desvio padrão da média; LI IC95%: limite inferior do intervalo de confiança 95%; LS IC95%: limite superior do intervalo de confiança 95%; Vmín: valor mínimo; Vmáx: valor máximo; CV%: coeficiente de variação.

Conforme referido na tabela 6, o volume aparente de distribuição obtido frente aos valores de referência se mostrou muito reduzido nos dois grupos de pacientes queimados. A variabilidade do parâmetro foi alta, sendo de 103,7% nos pacientes com função renal preservada e de 77,5% na função renal dialítica.

Tabela 6 - Volume aparente de distribuição em 31 seguimentos

Valor de referência: 0,56 a 0,82 L/kg

Fonte: Micromedex, 2010

Parâmetro	FRN (n=17)	Diálise (n=14)
Mediana	0,13	0,15
Média	0,23	0,23
DP	0,24	0,18
Vmín	0,02	0,05
Vmáx	0,76	0,45
LI IC 95%	0,12	0,14
LS IC 95%	0,35	0,32
CV%	103,7	77,5

Estatística: GraphPad Prism 4 para estatística descritiva. **Abreviaturas:** FR: função renal; DP: desvio padrão da média; LI IC95%: limite inferior do intervalo de confiança 95%; LS IC95%: limite superior do intervalo de confiança 95%; Vmín: valor mínimo; Vmáx: valor máximo; CV%: coeficiente de variação

Considera-se, portanto que ocorram profundas alterações na farmacocinética do fluconazol em pacientes queimados independentemente da função renal preservada ou não, em decorrência da redução do volume aparente de distribuição e da meia-vida biológica na mesma proporção, ou seja a extensão da distribuição do fluconazol se mostra reduzida e por conseqüência a permanência média do fármaco nestes pacientes está diminuída, justificando desta forma a perda da medicação administrada e as concentrações de vale ineficazes mesmo para as cepas sensíveis de *Candida albicans*. Desta forma, a terapia dose ajustada vem contribuir e justificar o tratamento.

Além disso, evidenciou-se alta variabilidade nos parâmetros cinéticos tanto nos seguimentos de pacientes com função renal preservada quanto na disfunção renal dialítica sugerindo imprevisibilidade da farmacocinética.

Comparou-se a farmacocinética do antifúngico em 31 seguimentos realizados para os pacientes distribuídos em dois grupos com base na função renal preservada *versus* insuficiência renal dialítica, tabela 7.

Tabela 7 – Farmacocinética do fluconazol em pacientes queimados

Parâmetro	Unidade	FRN (n=17)	Diálise (n=14)	p
$t_{(1/2)\beta}$	(hora)	8,1	8,3	0,7554
CL _T	(mL/min.kg)	0,3	0,3	0,9771
Vd	(L/kg)	0,13	0,15	0,7985

Estatística: Teste de Mann Whitney não paramétrico, dados não pareados, medianas, n=31

Abreviaturas: FRN: função renal normal; P: probabilidade, nível de significância $p < 0,05$; $t_{(1/2)\beta}$ meia vida biológica; CL_T: depuração plasmática; Vd: volume aparente de distribuição

A comparação entre seguimentos de pacientes com função renal preservada *versus* insuficiência renal dialítica, não evidenciou diferença significativa entre grupos, apesar da alteração evidente na farmacocinética do fluconazol nos pacientes grandes queimados.

Evidenciou-se alta variabilidade na farmacocinética do agente antifúngico considerando-se os 31 seguimentos realizados nos pacientes queimados, independentemente da função renal preservada (n=17) ou não (n=14), fato que indicou a necessidade da terapia dose ajustada. A concentração foi garantida pelo aumento da dose diária em 32% dos seguimentos. Adicionalmente, nos seguimentos de pacientes queimados com função renal reduzida (26%) realizou-se a redução da

dose diária de 400mg para 200mg 1x ao dia conforme referido anteriormente, tabela 3.

2.5 DISCUSSÃO

As infecções hospitalares constituem atualmente, um grave problema de saúde pública mundial. Reporta-se hoje o surgimento de cepas resistentes aos vários agentes infecciosos, reduzindo-se a cada dia o arsenal terapêutico disponível para o tratamento das infecções fúngicas em pacientes queimados da Unidade de Terapia Intensiva. Uma vez que a prescrição dos agentes anti-infecciosos visa garantir a eficácia terapêutica, considera-se crítica a decisão a ser tomada pelo médico intensivista, no sentido de manter ou não o regime posológico de determinado agente requerido no controle da infecção. Por outro lado, os resultados de vale referentes às concentrações plasmáticas atingidas pelo antifúngico imediatamente antes da dose subsequente, não tem se mostrado índice como se acreditava anteriormente. Assim, torna-se pouco efetivo o acompanhamento laboratorial realizado através do controle terapêutico apenas pela coleta e determinação da concentração plasmática de vale.

A literatura é escassa relativamente ao monitoramento plasmático e ajuste de dose do fluconazol em pacientes queimados (BOUCHER *et al.*, 1998; RAYATT *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2010). Recomenda-se que a concentração plasmática mínima efetiva seja na ordem de 4µg/mL para a profilaxia antifúngica, na farmacoterapia da candidíase após dose diária de 100mg diários, entretanto o tratamento das infecções sistêmicas exige doses superiores que vão depender da função renal do paciente. Recomendam-se doses de 400mg ao dia para pacientes com função renal preservada, enquanto que a dose deve ser reduzida na insuficiência renal moderada e na disfunção renal dialítica

Apesar de o fluconazol apresentar farmacocinética linear na faixa de dose recomendada 100-1600mg/dia, as concentrações plasmáticas desse agente no decurso do tempo e o acúmulo de doses múltiplas previsto na terapia crônica dependem também do tempo de infusão. No presente estudo o monitoramento plasmático do fluconazol foi aplicado em pacientes grandes queimados (SCQ 30,1 a 47,2%) internados na Unidade de Terapia Intensiva. Esses pacientes receberam a dose empírica inicial no regime de 200mg a cada 12 horas, totalizando 400mg diários para o tratamento da infecção fúngica sistêmica. Em alguns períodos a

dose foi ajustada para 800mg por dia com base em monitoramento de vale. Por outro lado a dose foi reduzida para 200 mg diários nos pacientes com disfunção renal moderada e insuficiência renal dialítica. Por outro lado, Boucher *et al.* (1998) reportaram que a farmacocinética do fluconazol não está alterada em pacientes queimados, enquanto Ryatt *et al.* (2000) bem como mais recentemente Santos *et al.* (2010) reportaram alterações nas concentrações plasmáticas do fluconazol em queimados como consequência de profundas alterações na farmacocinética desse agente.

Com relação as concentrações de vale para o fluconazol e os parâmetros farmacocinéticos obtidos pela realização do presente estudo, esses dados estão de acordo com os reportados anteriormente para outros agentes antimicrobianos em queimados (GARRELTS; PETERIE, 1988; WEINBRER, 1999; BLANCHET, 2008).

Alta variabilidade inter-indivíduos registrada nos parâmetros a partir da investigação da farmacocinética pode ser em parte justificada pelo grande número de fatores dependentes do paciente queimado individual: superfície corpórea queimada (SCQ%), alterações orgânicas, peso, idade, função renal e estado de doença prévia associada. Por outro lado, destaca-se ainda que os pacientes queimados evidenciem alta variabilidade intra-indivíduo da farmacocinética de outros agentes terapêuticos utilizados no controle das infecções sistêmicas no decurso da internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), que dependeu da evolução do paciente na UTI, como por exemplo, da necessidade de drogas vasoativas, da integridade da função renal, do número de cirurgias realizadas (limpeza, desbridamento e enxerto), da cicatrização da ferida, de infecções bacterianas e fúngicas (GARRELTS; PETERIE, 1988; WEINBRER, 1999; BLANCHET, 2008).

No presente estudo, durante o período de internação e evolução clínica do queimado ocorreram alterações extensas demonstradas pela imprevisibilidade na farmacocinética do fluconazol e a alta variabilidade das concentrações plasmáticas de vale nos 31 seguimentos de 12 pacientes investigados. Desta forma, reforça-se ainda mais a necessidade do ajuste de dose para a garantia das concentrações plasmáticas ideais para o controle da infecção fúngica, uma vez que a dose recomendada é adequada em determinado momento da internação tornando-se

inadequada em outro (GARRELTS; PETERIE, 1988; WEINBRER, 1999; BLANCHET, 2008)

Evidenciou-se ainda profunda alteração na farmacocinética do fluconazol nos pacientes queimados, independentemente da função renal preservada ou na disfunção renal dialítica, fato que indicou a necessidade da terapia dose ajustada e o monitoramento cuidadoso do paciente internado durante o seguimento farmacoterapêutico. O aumento da dose diária foi realizado em 32% dos seguimentos dos pacientes com função renal preservada, enquanto que a redução da dose diária de 400mg para 200mg 1x ao dia foi requerida em todos os seguimentos de pacientes queimados com função renal reduzida.

A terapia antifúngica assistida nos pacientes queimados de prolongada internação e imunocomprometidos têm mostrado melhora clínica e evolução favorável do paciente pela substituição da terapia empírica inicial pela farmacoterapia dose ajustada baseada no monitoramento plasmático e estudo farmacocinético.

Finalmente, acredita-se que em médio prazo, outras ferramentas de estudo estarão disponíveis para o médico intensivista com relação ao ajuste de dose, de forma a possibilitar o estabelecimento de correlação *in vivo-in vitro* obtido através do monitoramento plasmático do fluconazol e determinação da concentração inibitória mínima do fungo, fornecida pelo Laboratório de Microbiologia a partir do isolamento da cepa.

2.6 CONCLUSÕES

A farmacocinética do fluconazol se mostrou alterada em pacientes queimados, registrando-se alta variabilidade nos diversos seguimentos realizados durante o tratamento da infecção fúngica. Não se evidenciou diferença significativa nos parâmetros pela comparação dos pacientes em seguimento com disfunção renal dialítica e função renal preservada.

Entretanto, com base no monitoramento plasmático e estudo farmacocinético realizado para o fluconazol no presente estudo justifica-se a terapia dose ajustada instituída pelo médico com aumento da dose diária de 400mg (dose inicial recomendada) para 600mg ou até 800mg nos seguimentos dos pacientes com função renal preservada, ou redução da dose diária inicial para 200mg 1x ao dia nos seguimentos de pacientes queimados com função renal reduzida.

A terapia antifúngica nos pacientes queimados de prolongada internação e imunocomprometidos têm mostrado melhora clínica e evolução favorável do paciente pela substituição da terapia empírica inicial pela farmacoterapia dose ajustada baseada no monitoramento plasmático e estudo farmacocinético.

CONCLUSÕES GERAIS

O método bioanalítico revalidado em CLAE-UV evidenciou para o fluconazol boa linearidade, seletividade e sensibilidade, além de boa estabilidade de curta duração, precisão e exatidão, mostrando-se, portanto adequado para a quantificação do analito em amostras de plasma com finalidade de monitoramento terapêutico e estudo farmacocinético deste agente em pacientes queimados.

A farmacocinética do fluconazol se mostrou alterada em pacientes queimados, registrando-se alta variabilidade nos diversos seguimentos realizados durante o tratamento da infecção fúngica. Ressalta-se que não se evidenciou diferença significativa entre os pacientes em seguimento com disfunção renal dialítica e função renal preservada relativamente aos parâmetros meia vida biológica, depuração plasmática e volume aparente de distribuição. Finalmente, a terapia antifúngica nos pacientes queimados imunocomprometidos de prolongada internação na UTI evidenciou evolução favorável do paciente pela substituição da terapia empírica inicial pela farmacoterapia dose ajustada baseada no monitoramento plasmático e estudo farmacocinético.

REFERÊNCIAS

ABA – AMERICAN BURN ASSOCIATION. Disponível em: <http://www.ameriburn.org/resources_factsheet.php>. Acessado em: 27 Set. 2010.

AMB - ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA E CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. **Projeto Diretrizes: Queimaduras: Diagnóstico e Tratamento Inicial**. 2008a. Disponível em: <<http://www.projetodiretrizes.org.br>>. Acessado em: 25 Jun. 2010.

AMB - ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA E CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. **Projeto Diretrizes: Queimaduras – parte II: Tratamento da Lesão**. 2008b. Disponível em: <<http://www.projetodiretrizes.org.br>>. Acessado em: 26 Jun. 2010.

BANG, L. R.; GANG, R. K.; SANYAL, S. C.; MOKADDAS, E.; EBRAHIM, M. K. **Burn septicemia: an analysis of 79 patients**. Burns, v.24, p.354-61. 1998.

BLANCHET, B.; JULLIEN, V.; VINSONNEAU, C.; TOD, M. **Influence of Burns on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Drugs used in the Care of Burn Patients**. Clinical Pharmacokinetics, v.47, n.10, p. 635-654. 2008.

BOUCHER, B. A.; KUHL, D. A.; HICKERSON, W. L. **Pharmacokinetics of systemically administered antibiotics in patients with thermal injury**. Clinical Infectious Diseases, v.14, p.458-63. 1992.

BOUCHER, B. A.; KING, S. R.; WANDSCHNEIDER, H. L.; HICKERSON, W. L.; HANES, S. D., HERRING, V. L. **Fluconazole pharmacokinetics in burn patients**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.3, p.930-3. 1998.

BRAMMER, K. W.; FARROW, P. R.; FAULKNER, J. K. **Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans**. Reviews of Infectious Diseases, v.12, suppl. 3, p.S318-S326, 1990.

BRASIL, Ministério da Saúde. ANVISA. **Resolução - RE nº899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2 Jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 4 fev. 2010.

COCIGLIO, M.; BRANDISSOU, S.; ALRIC, R.; BRESSOLLE, F. **High-performance liquid chromatographic determination of fluconazole in plasma.** Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. v.686, p.11-17. 1996

COCKCROFT, D. W; GAULT, M. H. **Prediction of creatinine clearance from serum creatinine.** Nephron. v.16, n.1, p.31-41. 1976.

DE SANTI, L. **Phathophysiology and current management of burn injury.** Advance Skin Wound Care. n.18, p.323-332, 2005.

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

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry: Bioanalytical Method validation.** U.S. Department of Health and Human Services, 2001.

FLORES-MURRIETA, F. J.; GRANADOS-SOTO, V.; HONG, E. **A simple and rapid method for determination of fluconazole in human plasma samples by high performance liquid chromatography.** Journal of Liquid Chromatography. v.17, p.3803-11. 1994.

FRY, D. E. **The importance of antibiotic pharmacokinetics in critical illness.** American Journal of Surgery. v.172, suppl.6A, p.20S-5S. 1996.

GARRELTS, J. C.; PETERIE, J. D. **Altered vancomycin dose vs. serum concentration relationship in burn patients.** Clinical Pharmacology & Therapeutics. v.44, p.9-13. 1988.

GOA, K. L.; BARREDELL, L. B. **Fluconazole: An Update of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use in Major Superficial and Systemic Mycoses in Immunocompromised Patients.** Drugs. v.50, n.4, p.658-90. 1995.

GOMES, D.R.; CABRAL M., **Avaliação pré-hospitalar.** In: GOMES, D.R.; SERRA, M.C.; In: GOMES, D.R.; SERRA, M.C.; MACEIRA, L. Conduas atuais em queimaduras. Rio de Janeiro : Revinter, 2001.

HCFMUSP - HOSPITAL DE CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Guia de Utilização de Antimicrobianos e recomendações para a prevenção de infecções hospitalares.** 2009-2011. Disponível em: <www.hcnet.usp.br>. Acessado em: 25 Jun. 2010.

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.** Therapeutic Drug Monitoring. v.14, p.306-11. 1992.

KECK, M.; HERNDON, D. H.; KAMOLZ, L. P.; FREY, M.; JESCHKE, M. G. **Phatophysiology of burns.** Wien Med Wochenschr, v.159, n.13-14, p.327-336, 2009.

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.** Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. v.663, p.435-51, 1994.

MICROMEDEX. **Micromedex® Healthcare Series**, Inc., Greenwood Village, Colorado, 2010.

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.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.37, p.465-72, 1996.

RAYATT, S.; WEIMBRE, M.; CLARKE, J. **Fluconazole use in burns patients.** Burns. v.26, n.1, p.109-10, 2000.

RICHARDSON, K.; COOPER, K.; MARRIOTT, M. S.; TARBIT, M. H.; TROKE, P. F.; WHITTLE, P. J. **Discovery of fluconazole, a novel antifungal agent.** Reviews of Infectious Diseases. v.12, suppl.3, p.S267-S71, 1990.

SANTOS, S. R. C. J.; CAMPOS, E. V.; SANCHES, C.; GÓMEZ, D. S.; FERREIRA, M. C. **Fluconazole Plasma Concentration Measurement by Liquid Chromatography for Drug Monitoring of Burn Patients.** Clinics. v.65, n.2, p.237-43. 2010.

SHERIDAN, R.L. **Burns.** Critical Care Medicine. v.30, n.11, p.500-514, 2002.

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.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.36, n.3, p.603-6, 1992.

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

WEINBREN, M. J. **Pharmacokinetics of antibiotics in burn patients.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. n.44, p.319-27. 1999.

ANEXO A

ANEXO B

ANEXO C

