

**ANFOTERICINA B: DETERMINACIÓN EN DIVERSOS
FLUIDOS BIOLÓGICOS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA.
APLICACIÓN A ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS Y DE
ESTABILIDAD QUÍMICA**

ROSA M^a LÓPEZ GALERA

SEPTIEMBRE 2000

ANFOTERICINA B: DETERMINACIÓN EN DIVERSOS FLUIDOS BIOLÓGICOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA. APLICACIÓN A ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS Y DE ESTABILIDAD QUÍMICA

Tesis doctoral presentada por **Rosa M^a López Galera**, realizada en la Unidad de Monitorización de Fármacos del Servicio de Bioquímica del Hospital General Vall d'Hebron de Barcelona, bajo la dirección del **Dr. Carles Pascual i Mostaza** y el **Dr. Josep Monterde i Junyent**. La tutora de esta tesis ha sido la **Dra. Margarida Sentís i Vilalta**.

Barcelona, septiembre de 2000.

Carles PASCUAL i MOSTAZA, doctor en Medicina, profesor asociado del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe de Servicio de Bioquímica del Hospital General Vall d'Hebron y **Josep MONTERDE i JUNYENT**, doctor en Farmacia, profesor asociado del Departamento de Farmacia de la Universidad de Barcelona y Jefe de Servicio de Farmacia de los Hospitales Vall d'Hebron.

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo titulado **ANFOTERICINA B: DETERMINACIÓN EN DIVERSOS FLUIDOS BIOLÓGICOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA. APLICACIÓN A ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS Y DE ESTABILIDAD QUÍMICA** ha sido realizado, bajo su dirección, por **Rosa M^a LÓPEZ GALERA**, licenciada en Farmacia, y se encuentra en condiciones de ser presentado y defendido ante el correspondiente tribunal para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firman la presente a Barcelona, el 29 de septiembre de 2000

Dr. Carles Pascual i Mostaza

Dr. Josep Monterde i Junyent

Esta tesis la dedico a mi marido Juan Carlos y a mi hijo Carlos, por su gran apoyo y cariño en todo momento.

Cuando empecé mi formación como farmacéutica interna residente en el Servicio de Bioquímica del Hospital General Vall d'Hebron, todavía no podía saber que ésta sería muy gratificante tanto a nivel profesional como personal. Especialmente, mi formación en la Unidad de Monitorización de Fármacos con Leonor Pou, supuso que me decantara, dentro del interesante campo de la Bioquímica, por una línea de trabajo e investigación que me apasiona, la cromatografía líquida para la determinación de fármacos con aplicación en la práctica clínica.

La presentación de esta memoria como compendio de publicaciones para optar al grado de Doctor, ha sido un esfuerzo colectivo, en el que cada profesional ha aportado su "granito de arena" en lo que a su parcela concierne, pero he de destacar, que sin la gran profesionalidad de Leonor Pou no hubiera sido posible. Ella me ha enseñado con criterio y rigor, y me ha animado en todo momento a que presentara esta memoria.

He de agradecer que mi trabajo ha tenido continuación en la aplicación de estudios farmacocinéticos, en los cuales también he tenido la oportunidad de participar.

Gracias Leonor. Por enseñarme. Por tu tiempo. Por tu amistad.

ÍNDICE

1.Introducción	1
Introducción	2
1.1 Clasificación y Tratamiento de las infecciones fúngicas	4
1.2 Estructura y mecanismo de acción de la AnB	5
1.3 Formas de administración de la AnB	6
1.4 AnB convencional y en formulaciones lipídicas	9
1.4.1 AnB convencional	9
1.4.2 AnB en complejo lipídico	10
1.4.3 AnB en dispersión coloidal lipídica	10
1.4.4 AnB en liposomas	11
1.5 Farmacocinética de la AnB	14
1.5.1 Absorción	14
1.5.2 Distribución	14
1.5.3 Eliminación	15
1.6 Eficacia e indicaciones de la AnB	18
1.6.1 Infecciones del SNC	18
1.6.2 Infecciones pulmonares	18
1.6.3 Peritonitis	19
1.6.4 Terapia empírica y profiláctica en pacientes trasplantados neutropénicos	19
1.6.5 Infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos	20
1.6.6 Infecciones genitourinarias	21
1.6.7 Infecciones oftálmicas	21
1.6.8 Infecciones dermatológicas	21
1.6.9 Infecciones parasitarias	21
1.7 Efectos adversos y toxicidad de la AnB	22
1.7.1 Nefrotoxicidad	22
1.7.2 Efectos hematológicos	23
1.7.3 Fiebre y escalofríos	23
1.7.4 Tromboflebitis	23
1.8 Interacciones farmacológicas	24
1.9 AnB en Intralipid 20%	25
1.10 AnB en solución acuosa para inhalación	28
1.11 AnB inhalada en la profilaxis del trasplante de pulmón	30
1.12 Métodos de determinación de la AnB	33
2. Objetivos	36
3. Material e instrumentación	39
3.1 Estándares y reactivos	40
3.2 Material	40
3.3 Especímenes Equipo de cromatografía	41
3.5 Espectrofotómetro	42
3.6 Otros equipos	42
4. Resultados y discusión	43
4.1 Determinación de AnB en suero	44
4.1.1 Metodología experimental	45
4.1.1.1 Preparación de soluciones estándares y calibradores	45
4.1.1.2 Pretratamiento de las muestras	45

4.1.1.3 Condiciones cromatográficas	46
4.1.1.4 Recuperación	46
4.1.1.5 Linealidad	46
4.1.1.6 Imprecisión intraserial	47
4.1.1.7 Imprecisión interserial	47
4.1.1.8 Curva de calibración y cálculo de resultados	47
4.1.2 Resultados y discusión	47
4.1.2.1 Estandarización de las condiciones cromatográficas	47
4.1.2.2 Pretratamiento de las muestras	48
4.1.2.3 Validación de las prestaciones analíticas	49
4.1.2.3.1 Recuperación	49
4.1.2.3.2 Linealidad	50
4.1.2.3.3 Imprecisión intraserial	51
4.1.2.3.4 Imprecisión interserial	51
4.2 Estabilidad de AnB en Intralipid 20%	53
4.2.1 Metodología experimental	54
4.2.1.1 Preparación de soluciones estándares y calibradores	54
4.2.1.2 Preparación y pretratamiento de las muestra	54
4.2.1.2.1 Preparación	54
4.2.1.2.2 Pretratamiento para el análisis cuantitativo	55
4.2.1.2.3 Interferencias en el análisis cuantitativo	55
4.2.1.3 Condiciones cromatográficas	56
4.2.1.4. Recuperación	56
4.2.1.5 Imprecisión intraserial	56
4.2.1.6 Imprecisión interserial	57
4.2.1.7 Estabilidad	57
4.2.1.8 Curva de calibración y cálculo de resultados	57
4.2.2 Resultados y discusión	57
4.2.2.1 Adaptación de las condiciones cromatográficas	57
4.2.2.2 Pretratamiento de las muestras	58
4.2.2.3 Interferencias en el análisis cuantitativo	59
4.2.2.4 Validación de las prestaciones analíticas	59
4.2.2.4.1 Recuperación	59
4.2.2.4.2 Imprecisión intraserial	60
4.2.2.4.3 Imprecisión interserial	60
4.2.2.5 Estabilidad	60
4.2.2.6 Aplicabilidad	62
4.3 Determinación de AnB en secreciones respiratorias	65
4.3.1 Metodología experimental	66
4.3.1.1 Preparación de soluciones estándares y calibradores	66
4.3.1.2 Pretratamiento de las muestras	66
4.3.1.2.1 Broncoaspirado	66
4.3.1.2.2 Lavado broncoalveolar	67
4.3.1.3 Condiciones cromatográficas	67
4.3.1.4 Recuperación	68
4.3.1.5 Imprecisión intraserial	68
4.3.1.6 Imprecisión interserial	68
4.3.1.7 Estabilidad	68
4.3.1.8 Curva de calibración y cálculo de resultados	69
4.3.2 Resultados y discusión	69
4.3.2.1 Adaptación de las condiciones cromatográficas	69
4.3.2.2 Pretratamiento de las muestras	70

4.3.2.3 Validación de las prestaciones analíticas	71
4.3.2.3.1 Recuperación	71
4.3.2.3.2 Imprecisión intraserial	71
4.3.2.3.3 Imprecisión interserial	72
4.3.2.4 Estabilidad	73
4.3.2.5 Aplicabilidad	74
5. Conclusiones	77
6. Agradecimientos	80
7. Bibliografía83
8. Anexo: Publicaciones y comunicaciones de estudios con AnB	102

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La incidencia de infecciones fúngicas ha aumentado en los últimos años debido, fundamentalmente, al incremento de situaciones clínicas que comportan alteraciones en los mecanismos de defensa del organismo tales como neoplasias, pacientes portadores de un trasplante y tratados con fármacos inmunosupresores o síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), entre otros. Es un hecho conocido que estos grupos poblacionales son altamente susceptibles de contraer infecciones fúngicas oportunistas (1-8).

La anfotericina B (AnB), comercializada en el año 1956, continúa siendo el fármaco de elección para el tratamiento de las micosis sistémicas, aunque su utilización no está exenta de toxicidad. A pesar de los años de experiencia clínica en el manejo de este fármaco, hasta mediados de los años 90 aún existían controversias sobre las formas de administración disponibles, la pauta posológica o la duración de la terapia, que permitieran una mayor eficacia en la terapéutica clínica con un menor riesgo de efectos adversos y toxicidad (9-16).

Las nuevas formas de administración de AnB en formulaciones lipídicas, comercializadas a partir de la segunda mitad de los años 90, han supuesto en la práctica clínica una mejora en la optimización de la terapia ya que su administración ha demostrado estar asociada a una menor incidencia de reacciones adversas (17-22).

En el ámbito hospitalario, antes del año 1995, debido a la falta de disponibilidad de las formas de administración en emulsiones lipídicas y liposomas, ha sido frecuente la utilización de AnB vehiculada en un excipiente de características lipófilas como es el Intralipid 20%, preparada como formulación magistral en el momento de la infusión endovenosa, ya que no se disponían de estudios de estabilidad que demostraran cuanto tiempo podía conservarse antes de su uso.

La administración de AnB vehiculada en Intralipid 20% ha mostrado estar asociada a un menor riesgo de efectos adversos y toxicidad respecto a la formulación convencional (AnB en glucosado al 5%). A consecuencia de este hecho, se han realizado estudios farmacocinéticos y comparativos de eficacia y toxicidad de las diferentes formulaciones para encontrar una posible explicación a la menor incidencia de reacciones adversas (23-36)

La aspergilosis pulmonar invasiva es una infección fúngica que puede aparecer como complicación en la clínica de pacientes inmunodeprimidos (neutropénicos, trasplante de médula ósea y de pulmón y pacientes con SIDA). La profilaxis de esta micosis se ha estado realizando habitualmente con AnB endovenosa, pero cada vez más y desplazando a la formulación anterior, se utiliza la administración de la forma inhalada en solución acuosa, demostrando una buena eficacia clínica exenta de los efectos adversos y toxicidad asociados a la administración endovenosa (37-39)

Los estudios publicados con AnB inhalada, tanto en animales (40-43) como en humanos (44-54), demuestran su eficacia clínica, pero faltan referencias en la literatura sobre técnicas de cuantificación de AnB en muestras respiratorias. En efecto, no hay trabajos que estudien su farmacocinética y distribución, dos aspectos muy importantes para explicar la eficacia con esta forma de administración.

En la estandarización y validación de métodos de cuantificación de fármacos, es fundamental, no sólo estar familiarizados y conocer las cuestiones técnicas inherentes al propio método que se va a desarrollar, sino tener también conocimientos de la cinética y la dinámica del fármaco que se quiere determinar.

La adaptación y evaluación de un método de cuantificación de fármacos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) permite la realización de estudios farmacocinéticos y de estabilidad química de diferentes formulaciones. Esto permite objetivar con que tratamiento se puede conseguir una mayor eficacia con el menor riesgo de reacciones adversas y toxicidad.

1.1 Clasificación y tratamiento de las infecciones fúngicas

Las infecciones fúngicas constituyen un grupo de enfermedades causadas por hongos, organismos de estructura eucariota.

Se conocen unas 175 especies de hongos capaces de producir enfermedades (micosis) en el hombre. Muchas de estas especies están limitadas por sus requerimientos nutritivos y por los mecanismos de defensa del huésped al invadir la piel y el tejido subcutáneo (55).

Las micosis pueden clasificarse en diversos grupos en función de donde asienta la enfermedad (9-12,55):

- Micosis cutáneas: dermatofitosis.
- Micosis subcutáneas: cromomicosis, entomomoforomicosis, esporotricosis, micetomas fúngicos y rinosporidiosis.
- Micosis profundas o sistémicas producidas por:
 - Hongos patógenos: coccidioidomicosis, blastomicosis, histoplasmosis y paracoccidioidomicosis.
 - Hongos oportunistas: aspergilosis, candidiasis, criptococosis y mucormicosis.

El tratamiento de las infecciones fúngicas está destinado a eliminar el hongo causante de la enfermedad y además, en el caso de las micosis sistémicas oportunistas, a disminuir la frecuencia y gravedad de las mismas.

Desde finales de los años 50 hasta la actualidad se han desarrollado diversos grupos de fármacos con actividad antifúngica que actúan a distinto nivel de la bioquímica y fisiología del hongo. Éstos se clasifican tal como se describe a continuación (9,10):

- *Polienos*: Inhiben la síntesis de ergosterol, el principal esteroide implicado en la integridad de la membrana celular; también inducen a la formación de radicales libres mediante oxidación aumentando la permeabilidad de la

membrana. Pertenecen a este grupo la AnB y la nistatina.

- *Pirimidinas fluoradas*: Actúan interrumpiendo la síntesis de proteínas por inhibición de la síntesis de ADN y alteración del "pool" de aminoácidos por inhibición de la síntesis de ARN, como es el caso de la flucitosina.
- *Azoles*: Actúan inhibiendo al enzima Citocromo P450 lanosterol 14- - demetilasa que interviene en la síntesis del ergosterol. A su vez se subdividen en dos grupos, los imidazoles (cotrimazol, econazol, miconazol, ketoconazol) y los triazoles (itraconazol, fluconazol, saperconazol).
- *Equinocandinos*: Inhiben "*in vitro*" e "*in vivo*" la 1,3- -Glucan sintetasa. Dentro de este grupo se incluye la cilofungina.
- *Inhibidores de la quitin sintetasa*: Comprenden las polyoxinas y nikkomicinas.
- *Otros fármacos*: Las allylaminas (terbinafina) inhiben la escualeno epoxidasa; las pradimicinas y benanomicinas forman complejos con azúcares de manosa componentes de las membranas; la faerifungina y azasteroles actúan con mecanismo similar al de los polienos.

1.2 Estructura y mecanismo de acción de la AnB

La AnB es un antibiótico que pertenece al grupo de los polienomacrólidos y se obtiene de la fermentación del hongo "*Streptomyces nodosus*" (grupo de los Actinomicetos) (9,10,12,13,15,16,56). Se aisló por primera vez en 1953 y empezó a comercializarse a finales de los años 50 (9).

En la actualidad se considera el antibiótico de elección en el tratamiento de las micosis sistémicas por su gran potencia como fungistático y fungicida (9,56), a pesar de la introducción en el mercado de nuevos agentes como los azoles (9,10).

Su estructura química (figura 1) está constituida por una parte hidrofóbica que contiene siete dobles enlaces conjugados, un éster interno y grupos metilo y otra parte hidrofílica con grupos hidroxilo, un carbonilo y un azúcar en forma de glicósido unido a la cadena cíclica poliénica (micosamina) con un grupo amino primario (10,11,15,56). Debido a esta estructura, la AnB se comporta de forma anfotérica y puede formar sales solubles tanto en medio básico como ácido (9,10,56).

Figura 1. ANFOTERICINA B

El comportamiento anfotérico de la AnB es probablemente el responsable de sus efectos biológicos. La AnB tiene afinidad por el componente esteroide de las membranas celulares presente en hongos, protozoos y mamíferos, pero no de bacterias, siendo el ergosterol, el principal esteroide de las membranas en hongos (56,57).

El primer mecanismo de acción fúngica de la AnB es la inhibición de la síntesis de ergosterol, en concreto, interrumpe el paso de lanosterol a ergosterol; esto produce una alteración en la permeabilidad de la membrana celular permitiendo una mayor filtración de moléculas intracelulares pequeñas, sobre todo de cationes monovalentes (Na^+ , K^+ , H^+), lo que conlleva un desequilibrio electrolítico y homeostático y, por consiguiente, la inhibición del crecimiento celular (10-13,15,16,56,57).

Se ha propuesto otro mecanismo de acción sobre los hongos, con efecto quimioterápico, por el cual la AnB induce a la estimulación de los macrófagos mediante procesos de oxidación e inmunomodulación (10,15,58). La presencia de metabolitos oxidativos en el medio, como el peróxido de hidrógeno, incrementa la autooxidación y la formación de radicales libres (59); todo ello contribuye a aumentar más la permeabilidad de la membrana celular potenciando las propiedades antifúngicas del fármaco.

1.3 Formas de administración de la AnB

La diversidad de tejidos que pueden ser infectados por hongos patógenos juntamente con la elevada actividad que presenta la AnB frente a éstos, ha generado el desarrollo de diversas formas farmacéuticas para su administración (13,14,16,57):

- *Formas farmacéuticas tópicas:* Cremas, lociones, colirios, geles y suspensiones orales y comprimidos (la AnB no se absorbe por vía oral), indicadas en micosis cutáneas, mucocutáneas, oculares y candidiasis orales.

- *Formas farmacéuticas parenterales:* Soluciones acuosas reconstituidas en suero glucosado al 5% y en dispersiones lipídicas (liposomas, emulsiones lipídicas) para su administración intravenosa, en el tratamiento de micosis sistémicas.
- *Soluciones para inhalación o nebulización:* Soluciones reconstituidas en agua estéril para inyección o glucosado al 5%; pueden usarse nebulizadas o en forma de spray nasal. Utilizadas en la prevención y tratamiento de micosis pulmonares.
- *Inyecciones intratecales:* Soluciones reconstituidas en agua estéril para inyección o glucosado al 5% ó 10%, administradas como instilación directa o inyección intralumbar, intracisternal o intraventricular. Se usa en los casos de meningitis criptocócicas resistentes al tratamiento de AnB endovenosa.
- *Administración intraperitoneal:* Soluciones reconstituidas en agua estéril para inyección o glucosado al 5%, administradas a través de un catéter o bien disueltas en el líquido de diálisis peritoneal. Se administra en las peritonitis fúngicas relacionadas con diálisis.
- *Inyecciones intrapleurales:* Soluciones reconstituidas en agua estéril para inyección. Se utiliza en el caso de infecciones fúngicas de la pleura.
- *Inyecciones intra-articulares:* Soluciones reconstituidas en agua estéril para inyección. Se usa en infecciones fúngicas articulares.
- *Inyecciones e instilaciones oftálmicas:* Se administran inyecciones subconjuntivales o intravitreales e instilaciones intraoculares de soluciones de AnB reconstituidas en agua estéril para inyección. Utilizadas en endoftalmitis.
- *Irrigaciones e instilaciones vesicales:* Soluciones reconstituidas en agua

estéril para inyección o en glucosado al 5%, que se usan en forma de irrigaciones continuas o instilaciones intermitentes de la vejiga, en los casos de candidurias.

AnB convencional y en formulaciones lipídicas

La administración de AnB por vía parenteral se ha realizado habitualmente mediante perfusiones intravenosas lentas, donde el fármaco, en la forma de sal sódica de deoxicolato de AnB reconstituida en agua estéril para inyección, se ha diluido en soluciones glucosadas estériles al 5% (forma convencional). Dicha administración ha ido ligada a una elevada frecuencia de efectos adversos, que se describen en el apartado 1.7 de la introducción. Desde finales de la década de los años ochenta, se ha intentado el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas parenterales de AnB con el fin de mejorar su eficacia y seguridad (11). El carácter lipofílico de la molécula de AnB sugirió la posibilidad de administrar el fármaco en emulsiones lipídicas o encapsulado en liposomas (AnB liposomal). En la tabla 1 se exponen los diferentes preparados de AnB existentes en la actualidad con sus características más importantes, así como su año de comercialización.

1.4.1 AnB convencional

La AnB convencional (AnB-C) está comercializada desde el año 1956 en la presentación de 50 mg de la sal sódica del deoxicolato - que actúa como detergente- de AnB en un vial liofilizado para inyección (Fungizona). Se administra reconstituido con 10 mL de agua estéril en suero glucosado al 5% formando una dispersión micelar estable sólo en esta concentración de la solución glucosada. La perfusión endovenosa debe ser lenta, en una duración de 4 a 6 horas para prevenir reacciones adversas de anafilaxis asociadas a la propia infusión. La dosis de administración en adultos puede oscilar entre 0.5 y 1 mg/Kg/día, no excediendo de una concentración final de 0.5 mg/mL si se administra por una vía central o de 0.1 mg/mL si se hace por una vía periférica. La AnB reconstituida en agua es estable 24 h a la temperatura de 25°C y una

semana a 4°C; la solución acuosa diluida en suero glucosado al 5% es estable 5 días en el intervalo de temperatura de 4 a 25°C a las concentraciones de 0.2 a 1 mg/mL (60).

1.4.2 AnB en complejo lipídico

Es la primera formulación lipídica aprobada por la FDA y comercializada en noviembre de 1995. Su principal indicación original aprobada fue para el tratamiento de aspergilosis en pacientes refractarios o con intolerancia a la AnB convencional. En la actualidad sus indicaciones se han extendido al tratamiento de todas las infecciones fúngicas sistémicas (17).

El complejo lipídico con la AnB (ABCL) está formado por el fármaco y los lípidos dimiristoilfosfatidilcolina y dimiristoilfosfatidilglicerol en la proporción molar 7:3, formando unas bicapas en las cuales se sitúa interiormente la AnB dando lugar a unas vesículas multilamelares de gran tamaño. Debido a este elevado tamaño de partícula (>100 nm), el ABCL es rápidamente eliminado de la circulación por el sistema retículo endotelial (17-18).

El ABCL está comercializado en la presentación de 100 mg/20 mL como suspensión en vial de un solo uso. Se administra diluido en suero glucosado al 5% a una concentración final de 1 mg/mL o bien a la dosis de 2.5 mg/Kg/día durante 2 horas en adultos. En pacientes pediátricos puede administrarse hasta una concentración final y máxima de 2 mg/mL, teniendo en cuenta el potencial riesgo de anafilaxis. Las diluciones en suero glucosado al 5% son estables 6 horas a temperatura ambiente y 15 horas en refrigeración y protegidas de la luz (17).

1.4.3 AnB en dispersión coloidal lipídica

La AnB en dispersión coloidal (ABDC) fue aprobada por la FDA en noviembre de

1996 para el tratamiento de la aspergilosis invasiva en pacientes refractarios o con intolerancia a las dosis terapéuticas de la AnB convencional. En la actualidad, aunque se ha propuesto como nueva aplicación para la terapia empírica en la fiebre por neutropenia, no ha recibido la aprobación por no haber suficientes datos (17).

Es la única formulación lipídica que contiene verdaderas estructuras liposomales. El ABDC es un complejo de AnB con sulfato de colesterol en proporción molar 1:1, de manera que dos moléculas de AnB se incorporan en dos moléculas de sulfato de colesterol, formando un tetrámero con una parte hidrofóbica y otra hidrofílica. Estos tetrámeros se agrupan en forma de espiral dando lugar a una estructura tipo disco (17-18).

El ABDC está comercializado en la presentación como viales liofilizados estériles de 50 ó 100 mg. Se reconstituyen en agua estéril para inyección para una concentración de AnB de 5 mg/mL. Se administra diluido en suero glucosado al 5% a la dosis habitual de 1 mg/kg/h y en un tiempo mínimo de 2 horas. La solución reconstituida en agua es estable 48 horas refrigerada. La inestabilidad física de la dispersión es un factor limitante de la caducidad de la ABDC diluida en suero glucosado al 5%, siendo estable sólo 14 días a la concentración de 0.1 a 2 mg/mL a temperatura entre 4 y 23°C protegido de la luz (17-18).

1.4.4 AnB en liposomas

Es la última formulación lipídica aprobada en 1997 por la FDA, aunque en Europa se utiliza desde finales del año 95. En un principio se aprobó para la aspergilosis, candidiasis e infecciones por criptococosis en pacientes refractarios o con intolerancia a la AnB convencional. Recientemente ha sido aprobada la indicación para el tratamiento empírico de la fiebre por neutropenia (17).

La AnB liposomal (AnB-L) está formada por pequeñas vesículas unilamelares (<100 nm) con una sola bicapa lipídica compuesta por fosfatidilcolina

hidrogenada, colesterol y disteroil fosfatidilglicerol en proporción molar 2:1:0.8 (18).

La AnB-L está comercializada en la presentación de vial liofilizado estéril para administración endovenosa con 50 mg de AnB. Se reconstituye con 12 mL de agua estéril, y se agita fuertemente durante 30 segundos para la completa dispersión de la AnB-L hasta obtener una concentración de 4 mg/mL. Para su administración la solución reconstituida se diluye en suero glucosado al 5% a una concentración final de 1 a 2 mg/mL. En paciente pediátricos se puede administrar a bajas concentraciones de 0.2 a 0.5 mg/mL. Los viales reconstituidos deben guardarse refrigerados y son estables hasta 24 horas y la dilución en suero glucosado no debe administrarse más de 6 horas posteriores a la dilución (17).

Tabla 1. Características de las formulaciones de administración endovenosa de la AnB (17- 19)

Formulación	Nombre comercial	Estructura	Tamaño de partícula	Año de comercialización
AnB convencional (AnB-C)	Fungizona	micelas	<10 µm	1955 ¹ , 1956 ²
AnB en complejo lipídico (ABCL)	Abelcet	discos complejos	1.6-11.1µm (90% de partículas 1.6-6 µm)	1995 ¹ , 1996 ²
AnB en dispersión coloidal (ABDC)	Amphotec ^{®1} Amphocil ^{®2}	cintas	115 nm de diámetro, 4 nm de espesor	1996 ¹ , 1998 ²
AnB en liposomas (AnB-L)	Ambisome [®]	esferas unilamelares	45-80 nm de diámetro	1997 ¹ , 1995 ²

¹Estados Unidos

²Europa

1.5 Farmacocinética de la AnB

La farmacocinética de la AnB es relativamente compleja siguiendo un modelo bi o tricompartmental. El comportamiento en la fase de distribución y de eliminación varía en función de la formulación administrada. Ello es debido a las características físico-químicas, a la estructura configuracional que adoptan, al tamaño y a la composición de lípidos. Por otra parte, la mayoría de estudios se han realizado con la AnB convencional debido a los años de experiencia en el manejo con esta especialidad, por lo que se conoce mejor las diferentes fases de la cinética cuando se administra en esta forma.

1.5.1 Absorción

La AnB es un fármaco que prácticamente no se absorbe por vía oral (sólo se detecta un 5% de la dosis administrada) y se emplea normalmente por esta vía para uso tópico y localizado de la infección. Respecto a las otras vías de administración, la intramuscular es muy irritante y no se administra de esta forma (9,10,12,15,56). Para el tratamiento de las infecciones sistémicas, se debe de administrar por vía endovenosa en las diferentes formulaciones: convencional (AnB-C) y lipídicas (ABCL, ABDC, AnB-L) diluidas en suero glucosado al 5% (9,10,12,15,16), de forma que, la biodisponibilidad de la AnB es del 100%.

1.5.2 Distribución

AnB-convencional: Se distribuye ampliamente en diferentes tejidos; sólo un 10% de la dosis permanece en plasma. Su volumen de distribución es aproximadamente de 4L/Kg, lo que refleja la amplia distribución tisular del fármaco. Se acumula fundamentalmente en hígado, riñón, pulmón, corazón, músculo y glándulas adrenales. Se une fuertemente a proteínas (90-95%), principalmente a α -lipoproteínas, eritrocitos y colesterol en plasma (9,10,56). La AnB casi no atraviesa la barrera hematoencefálica, encontrándose concentraciones muy bajas en líquido cefalorraquídeo (2-4% de la

concentraciones séricas) (61); también penetra poco en otros fluidos biológicos (57). En adultos tras una dosis de 0.6 mg/Kg/día administrada en una perfusión de 6 horas, se alcanzan unas concentraciones máximas (C_{max}) y mínimas (C_{min}) entre 1 a 3 y 0.2 a 0.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (10).

AnB-complejo lipídico: Por su gran tamaño es captada fácilmente por el sistema retículo endotelial y se distribuye de forma rápida y extensa en los tejidos, presentando el mayor volumen de distribución de todas las formulaciones, aproximadamente de 150 L/Kg. Concentraciones tisulares de AnB determinadas en órganos humanos demuestran que se acumula preferentemente en bazo, pulmón, hígado y riñón por este orden (18,20). La unión a proteínas plasmáticas es similar a la de la AnB-convencional (18).

AnB-dispersión coloidal: Se han realizado muy pocos estudios farmacocinéticos con esta formulación. Los parámetros farmacocinéticos a la dosis administrada de 4 mg/Kg/día no parecen presentar diferencias significativas de los obtenidos en otros estudios con la AnB-convencional (21). Se distribuye ampliamente en tejidos, con un volumen de distribución aparente de 4-5 L/kg (18).

AnB-lipsomal: Por su tamaño (< 100 nm) no es captada de la misma forma por el sistema retículo endotelial como las otras formulaciones, de manera que presenta un volumen de distribución muy pequeño si se compara con éstas, del orden de 0.1-0.2 L/kg. Por el contrario, la C_{max} y el área bajo la curva (AUC) son mucho más elevados que en el resto. Estudios realizados en humanos, demuestran que se acumula preferentemente en bazo y en menor proporción en riñón y pulmón (22).

1.5.3 Eliminación

La AnB-convencional sigue un comportamiento de eliminación bifásico; la semivida ($t_{1/2}$) en la fase inicial es de 24 a 48 horas, siguiéndole una fase de eliminación terminal más larga con una $t_{1/2}$ de 15 días, debido probablemente a la elevada fijación del fármaco a los tejidos periféricos (9,10,56,57,62).

Se han detectado niveles de AnB en suero 12 días después de acabar el tratamiento y en orina de 27 a 35 días de haber dejado de administrarse (9,10). También se han detectado en tejidos, sobre todo en hígado y riñón, 12 meses después de haber acabado la terapia (10).

La excreción renal de AnB sin metabolizar varía de un 3% a un 5% (detectables 24 horas después de la administración) (9,57) y en bilis de un 0.8% a un 14% de la dosis diaria administrada, por lo que no es necesario modificar la dosis en pacientes con fallo renal o hepático (9). Alrededor de un 60% del metabolismo de eliminación de la AnB no está establecido, aunque se han realizado estudios para conocer mejor dicho metabolismo, encontrándose una serie de productos de la metabolización que no han sido identificados, pudiendo ser resultado de un probable metabolismo hepático (56). En humanos el aclaramiento total es bajo, oscilando entre 16.7 a 39.9 mL/min. La AnB es una molécula de elevado peso molecular y no se elimina por diálisis; el aclaramiento del fármaco en hemodiálisis representa el 3-5% del aclaramiento de creatinina, por lo tanto, los pacientes no necesitan ajuste de dosis de AnB (9,10,12,56); sólo en el caso de pacientes hiperlipidémicos, las concentraciones decrecen aparentemente debido al complejo lipoprotein-AnB que se forma en la membrana de diálisis (10,63).

Los diferentes estudios farmacocinéticos realizados con formulaciones lipídicas de la AnB indican que la AnB-complejo lipídico presenta una $t_{1/2}$ de fase inicial y terminal y un aclaramiento muy elevados (superior a la AnB-convencional) debido a su gran penetración en tejidos; la AnB-dispersión coloidal tiene una $t_{1/2}$ similar a la AnB-convencional pero su aclaramiento es más elevado; para la AnB-liposomal tanto la $t_{1/2}$ como el aclaramiento son inferiores con respecto a la AnB-convencional (118,60).

En la tabla 2 se exponen los parámetros farmacocinéticos más significativos de las diferentes formulaciones de la AnB a las dosis de administración más frecuentes. Estos valores están basados en las determinaciones de las concentraciones plasmáticas de AnB total en humanos tras la administración de dosis múltiples por vía endovenosa.

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos de las formulaciones de administración endovenosa de la AnB (18, 19)

Formulación	Dosis (mg/Kg/día)	Parámetros				
		C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	V_d (L/kg)	$t_{1/2}$ (h)	Cl (mL/h/kg)
AnB-C	0.6	1.1 \pm 0.2	17.1 \pm 5	5 \pm 2.8	27 \pm 10	38 \pm 15
	1	1.8 \pm 0.3	18.6 \pm 9.7	2.7 \pm 1.6	24 \pm 13	39.9 \pm 20
ABCL	5	1.7 \pm 0.8	14 \pm 7	131 \pm 7.7	380 \pm 486	436 \pm 188.5
ABDC	4	2.9	36	4.1	28.2	125
	5	3.1	43	4.3	27	117
AnB-L	2.8 – 3	48 \pm 39	466 \pm 171	0.09 \pm 0.06	8.7 \pm 4.3	6.7 \pm 4
	5	83 \pm 35.2	555 \pm 311	0.11 \pm 0.08	8.6 \pm 3.1	11 \pm 6

C_{max} : Concentración máxima plasmática

AUC: Área bajo la curva concentración-tiempo

V_d : Volumen de distribución

$t_{1/2}$: Semivida de eliminación de fase inicial

Cl: Aclaramiento total de creatinina

1.6 Eficacia e indicaciones de la AnB

Las diferentes formulaciones de AnB por vía endovenosa se utilizan de manera generalizada para el tratamiento de las diversas infecciones fúngicas, presentando similar eficacia clínica. Las dosis de administración están determinadas, principalmente, por la forma farmacéutica empleada.

1.6.1 Infecciones del Sistema Nervioso Central (SNC)

La AnB atraviesa con dificultad la barrera hematoencefálica. Constituye una terapia alternativa al tratamiento con azoles (sobre todo fluconazol). En la meningitis criptocócica causada por *Cryptococcus neoformans* se administra por vía endovenosa asociada a flucitosina oral (9,64,65). En pacientes con reinfección o resistencias al criptococo, se adiciona AnB intratecal al tratamiento anterior (66).

En las meningitis causadas por otros hongos como *Sporothrix shenkii*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum*, el tratamiento debe realizarse con AnB por vía endovenosa (9,14,64), y las causadas por especies de *Candida spp.* se combina la AnB endovenosa con flucitosina oral (9). A pesar de ello, existen especies de cándida sensibles a los azoles, de manera que, en función de la sensibilidad de estas especies y de la localización de la infección, se podrá optar por la administración sólo de un antifúngico azólico. Sin embargo, para las especies de cándidas resistentes a éstos, el tratamiento de elección es con AnB (9).

1.6.2 Infecciones pulmonares

En las infecciones fúngicas pulmonares como blastomicosis, sporotricosis, histoplasmosis y coccidioidomicosis, la AnB se administra por vía endovenosa.

En las invasiones pulmonares y extrapulmonares por aspergilosis, candidiasis y criptococosis, la AnB endovenosa se asocia a flucitosina oral y en el caso sólo de aspergilosis también puede asociarse a rifampicina oral (9). En los últimos años se ha

incorporado en la práctica clínica la administración de AnB inhalada como profilaxis y tratamiento de la aspergilosis pulmonar (54, 67-69).

1.6.3 Peritonitis

Las peritonitis fúngicas se clasifican en dos tipos: relacionadas con diálisis y no relacionadas (resultado de perforación visceral). La mayoría están causadas por *Candida albicans* y menos frecuente por otras especies de *Candida spp.* y *Aspergillus spp.*

En las infecciones relacionadas con diálisis se administra AnB endovenosa e intraperitoneal, a través de un catéter, a bajas dosis durante un período de 7 a 14 días. Cuando la administración a través del catéter está contraindicado, se administra diluida en el líquido de diálisis peritoneal a la misma dosis que en el caso anterior (9,70).

En las peritonitis asociadas a perforación visceral, además de administrar AnB endovenosa, se realiza corrección quirúrgica, lavado peritoneal y terapia con antimicrobianos de amplio espectro (70).

El tratamiento prolongado con AnB intraperitoneal se asocia a una elevada probabilidad de fibrosis peritoneal; en estos casos se aconseja la administración de AnB a dosis más bajas combinada con otros agentes antifúngicos (71).

1.6.4 Terapia empírica y profiláctica en pacientes trasplantados y neutropénicos

La terapia empírica de AnB es significativamente beneficiosa en pacientes con leucemia aguda maligna tratados con antibióticos de amplio espectro y con sospecha de infección fúngica (72).

Las infecciones fúngicas más frecuentes en trasplantados de médula ósea se deben a especies de *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus neoformans* y raramente a *Blastomyces dermatitidis* (73); se administra AnB endovenosa, siendo muy efectivo en

el tratamiento de pneumonías causadas por *Aspergillus spp.* (74).

Como profilaxis, puede administrarse AnB vía oral en varias dosis para reducir la colonización gastrointestinal; también se puede dar AnB en tabletas y suspensión oral combinando la terapia con geles orales (75). La administración de AnB vía nasal reduce la colonización por *Aspergillus spp.* (76).

1.6.5 Infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos

Las infecciones fúngicas oportunistas pueden ser superficiales e invasivas; las más frecuentes son:

- *Candidiasis*: Causadas por especies de *Candida spp.* Las candidiasis orales son las más comunes. En la candidiasis orofaríngea, puede administrarse AnB endovenosa como alternativa al tratamiento de primera elección con nistatina tópica o fluconazol oral (77); la candidiasis mucocutánea se trata con azoles o con AnB por vía tópica (78). En las formas diseminadas sistémicas se utiliza un antifúngico azólico o AnB endovenosa (79,80) y en la meningitis candidiásica se combina con flucitosina (81).
- *Criptococosis*: Causadas por *Cryptococcus neoformans*. Afecta a un 6-13% de los pacientes con SIDA (92). Se administra AnB endovenosa sola o asociada a flucitosina a dosis más bajas (16). La AnB endovenosa en su formulación liposomal da buenos resultados en las criptococosis diseminadas (1,2). La terapia combinada con fluconazol e itraconazol mejora el pronóstico en estos pacientes (31).
- *Histoplasmosis*: Causadas por *Histoplasma capsulatum*. Las formas diseminadas se tratan con AnB endovenosa (4,5) y es altamente efectivo en un 80% de los casos; se considera de elección en terapia de inducción y mantenimiento (6,7).
- *Coccidioidomicosis*: Se deben a especies de *Coccidioidomyces spp.* que causan

meningitis; se administra AnB endovenosa e intratecal y para las formas más severas se asocia a ketoconazol (4,8).

1.6.6 Infecciones genitourinarias

La mayoría son cistitis causadas por diversas especies de *Candida spp.* El tratamiento más efectivo consiste en instilaciones intermitentes en la vejiga con AnB, seguido de irrigaciones continuas a dosis de 50-75 mg/mL. También da buenos resultados el tratamiento con AnB endovenosa administrada en 4 horas y en una sola dosis (9).

1.6.7 Infecciones oftálmicas

La AnB penetra poco en humor vítreo y acuoso tras su administración por vía sistémica. En las infecciones de cornea causadas por *Aspergillus spp.*, la AnB se administra en gotas y en inyección subconjuntival (ésta puede causar decoloración amarilla en la conjuntiva y desarrollo de nódulos) (9). En las endoftalmitis causadas por *Candida albicans*, se administra en una sola inyección intravítrea de 5 µg asociada a una corta terapia endovenosa (81). En las conjuntivitis micóticas se dan instilaciones oculares durante 30 minutos a la dosis de 0.1 a 1 mg (9).

1.6.8 Infecciones dermatológicas

Las infecciones fúngicas dermatológicas están constituidas por infecciones cutáneas y mucocutáneas causadas por especies de *Candida spp.* Las cutáneas se tratan eficazmente con azoles (tópicos, orales), griseofulvina y AnB (loción crema al 3%); las mucocutáneas se tratan con nistatina o soluciones orales de AnB (9).

1.6.9 Infecciones parasitarias

- *Amebiasis*: La AnB es activa “*in vitro*” contra el protozoo *Naegleria fowleri* y es recomendada como tratamiento de primera elección en meningoencefalitis amebiana causada por este organismo; se administra en forma endovenosa e

intratecal y también asociada a miconazol, rifampicina o sulfafurazol (16,57).

- *Leishmaniasis*: La AnB endovenosa se administra como tratamiento de segunda elección en la leishmaniasis cutánea o mucocutánea americana causada por *Leishmania braziliensis* y *Leishmania mexicana* y en la leishmaniasis visceral o kala-azar causada por *Leishmania donovani* cuando existen resistencias al tratamiento convencional con derivados antimoniales (57).

1.7 Efectos adversos y toxicidad de la AnB

El comportamiento no selectivo de la AnB frente a los esteroides de las membranas celulares de eucariotas (ergosterol de hongos y colesterol de mamíferos), es la principal causa de sus efectos adversos (9,10). La administración de las nuevas formulaciones lipídicas ha conseguido reducir la incidencia de éstos aunque tampoco están exentas de toxicidad.

1.7.1 Nefrotoxicidad

La nefrotoxicidad es el efecto adverso más importante, afectando a los glomérulos y a la función tubular. Las manifestaciones clínicas son: azotemia, hipopotasemia, hipomagnesemia, hipocalcemia, acidosis tubular renal y disminución de la capacidad de concentración urinaria (10).

Los mecanismos que inducen a azotemia no están claros. Diveros estudios implican a las prostaglandinas y al factor de necrosis tumoral alfa. Generalmente la azotemia es reversible y la función renal se restablece cuando cesa el tratamiento (10).

La hipopotasemia es la complicación más común y ocurre aproximadamente en un 75% de los pacientes. El mecanismo que induce a la hipopotasemia se debe probablemente a un efecto tóxico directo sobre el túbulo distal que incrementa la permeabilidad al potasio y activa el recambio sodio/potasio (11).

Existen varias medidas para reducir la nefrotoxicidad producida por la AnB-

convencional: administración de manitol, sustitución por otras formulaciones lipídicas de la AnB y suplemento de potasio (11).

1.7.2 Efectos hematológicos

La concentración de hemoglobina disminuye en un 18-35% de los pacientes y se restablece al interrumpir el tratamiento (9,10). También se produce anemia que se caracteriza por ser normocítica y normocrómica, mediada probablemente por la supresión de la síntesis de eritrocitos y eritropoyetina (9,10,16); los efectos de la anemia también revierten al suspender el tratamiento (83).

La leucopenia rara vez se asocia a la administración de AnB, aunque estudios *“in vitro”* y en modelo animal sugieren que puede suprimir la función linfocitaria, aumentar el número de células productoras de anticuerpos y mejorar la inmunidad mediada por células y la actividad fagocitaria de los macrófagos (9).

1.7.3 Fiebre y escalofríos

Están frecuentemente asociados a la terapia con AnB y pueden estar mediados por el factor de necrosis tumoral e interleukinas-1 (84), también pueden estar mediados por prostaglandinas ya que la AnB es *“in vitro”*, un potente inductor de la síntesis de prostaglandina E₂ (85).

Estas reacciones agudas se contrarrestan con la administración conjunta de corticosteroides a bajas dosis (hidrocortisona o metilprednisolona), paracetamol, antiinflamatorios no esteroideos (aspirina, ibuprofeno) o meperidina (9).

1.7.4 Tromboflebitis

Es un efecto local común asociado a la perfusión endovenosa de AnB. Se debe al tratamiento prolongado y repetido en la misma vena conjuntamente con el pH ácido de la preparación reconstituida en solución de dextrosa al 5% (9). Las recomendaciones

para minimizar esta reacción son: infusión más lenta, adición de pequeñas dosis de heparina y evitar que las concentraciones de AnB excedan de 0.1 mg/mL (10).

1.8 Interacciones farmacológicas

Fármacos nefrotóxicos: Presentan interacciones con aquellos fármacos que se eliminan a nivel renal y tienen un mecanismo de toxicidad similar como son los aminoglucósidos, ciclosporina, pentamidina, vancomicina, metoxifluorano, etc. Se debe monitorizar la función renal determinando concentraciones de creatinina y urea séricas (14,57).

Corticosteroides: Interaccionan con la AnB por su mecanismo de acción en la función renal, como son los glucocorticoides y especialmente los mineralcorticoides que contribuyen a la hipopotasemia. Se debe monitorizar los electrolitos en suero y la función cardíaca (14,57).

Fármacos que afectan a la deplección de potasio: Pertenecen a este grupo los glucósidos cardiotónicos digitálicos y los bloqueantes neuromusculares no despolarizantes (curares). Se debe monitorizar las concentraciones séricas de potasio y corregir la hipopotasemia después de administrar estos fármacos. También el tratamiento con algunos diuréticos favorece la eliminación de potasio (14,57).

Fármacos antifúngicos: Es el caso de la flucitosina que potencia la acción farmacológica de la AnB por un mecanismo de sinergia (57).

Fármacos antineoplásicos: La administración conjunta de AnB con este grupo de fármacos potencia la toxicidad renal pudiendo provocar además, broncoespasmo e hipotensión en pacientes que reciben AnB (57).

Fármacos antibacterianos: La norfloxacin puede mejorar la actividad antifúngica de la AnB (57). La rifampicina y las tetraciclinas (minociclina) incrementan la actividad antifúngica de la AnB frente a especies de *Aspergillus spp.* (16).

1.9 AnB en Intralipid 20%

El elevado coste que suponía un tratamiento con AnB en un complejo lipídico o liposomal y la falta de comercialización de estos preparados en nuestro medio hasta la segunda mitad de los años 90, indujo en la práctica clínica, a la utilización de la AnB administrada en Intralipid 20% como formulación lipídica para mejorar la tolerancia del fármaco (23,24,27,28,31,35,36).

La AnB en la emulsión lipídica con Intralipid 20% (AnB-IL) es una formulación no comercializada preparada extemporáneamente en farmacia hospitalaria. Está formada por la sal sódica de deoxicolato de AnB reconstituida en agua estéril para inyección en Intralipid 20%. La solución lipídica utilizada en nutrición parenteral está constituida por aceite de soja (triglicéridos de ácidos grasos de cadena larga), glicerol y fosfolípidos.

Hasta la fecha en que se realizó el estudio de estabilidad de la AnB-IL, diversos autores ya habían utilizado esta formulación en estudios controlados y randomizados en los cuales se pretendía evaluar la eficacia clínica y la incidencia de reacciones adversas además de la comparación con la AnB administrada en la forma convencional (23-25,27-31,34-36).

La totalidad de estos estudios han sido publicados en la década de los años noventa, sobre todo en la primera mitad y antes de que se comercializaran las nuevas formulaciones lipídicas, utilizándose en el tratamiento de infecciones por especies de *Candida spp.*, en cobertura de pacientes neutropénicos y en casos de infecciones por especies de *Aspergillus spp.* y *Leishmania spp.* entre otros (23-26).

En un estudio controlado realizado en 22 pacientes VIH positivos con candidiasis oral, se comparó la eficacia, seguridad y farmacocinética de AnB-IL frente a la AnB administrada en la forma convencional. Se valoró la presencia de efectos adversos asociados a su administración parenteral (fiebre, náuseas, vómitos y otras), así como las concentraciones séricas de creatinina, electrolitos y magnesio. También se

determinaron los niveles del fármaco en suero y la evolución de la patología en cada uno de los pacientes. Los resultados mostraron una mejor tolerancia en los pacientes que recibieron AnB-IL sobre todo en lo que hacía referencia a la toxicidad renal. Los autores concluyen indicando que la toxicidad del fármaco se reduce cuando se administra en una emulsión lipídica aunque la eficacia clínica de ambos preparados fue semejante (23).

Otros autores han realizado estudios en pacientes afectados de neoplasias hematológicas y en un estado de neutropenia prolongada. La utilización de AnB-IL mejoró la tolerancia del fármaco, permitiendo la prolongación del tratamiento durante un tiempo superior que con la administración de AnB en la forma convencional (24,31).

En otro estudio prospectivo, comparativo, randomizado y abierto en 20 pacientes neutropénicos por quimioterapia en neoplasias hematológicas, la tolerancia clínica fue semejante para ambos grupos, aunque los valores de urea fueron inferiores en el grupo de pacientes que recibieron AnB-IL, permitiendo la reducción del volumen y tiempo de administración del tratamiento (36).

Estudios de eficacia *in vitro* e *in vivo* (26) y estudios clínicos prospectivos no comparativos que sólo evalúan la administración de AnB-IL tanto en pacientes neutropénicos, como en infecciones por *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Criptococo spp.* y *Leishmania spp.*, concluyen que puede representar beneficios sustanciales al reducir la nefrotoxicidad y los eventos adversos relacionados con la infusión de este medicamento (26,27,29,32-35).

De los estudios publicados hasta ese momento se deduce que la administración de AnB-IL comporta una disminución de las reacciones adversas respecto a la administración convencional, aunque la eficacia clínica de ambas formas es semejante.

El mecanismo por el cual se ha postulado que la AnB-IL altera menos la función renal podría estar relacionado con una acumulación del fármaco en el sistema retículo

endotelial, lo que supone una reducción de la concentración sérica del fármaco (86). Otros autores comentan que las células del sistema retículo endotelial tienen elevada afinidad por los lípidos, de forma que la AnB tiende a acumularse en órganos de este sistema como son el hígado, bazo y pulmón, por lo que podría resultar una ventaja terapéutica en aquellas situaciones clínicas que cursan con infección fúngica sistémica severa con invasión de estos órganos, como ocurre en los pacientes inmunocomprometidos (35).

Se han realizado estudios de estabilidad de AnB en suero glucosado al 5% (87-91). Sin embargo, uno de los problemas que planteaba la utilización de AnB-IL era la falta de datos publicados acerca de la estabilidad química y fisico-química de esta formulación. Debido a ello, fue de gran interés en su momento, realizar estudios de estabilidad de AnB en esta emulsión lipídica y disponer de datos que facilitaran la labor de su preparación y una seguridad en su administración en la práctica clínica.

Previamente al estudio de estabilidad de la AnB-IL se había adaptado y evaluado un método para la determinación de concentraciones de AnB en muestras séricas por cromatografía líquida de alta resolución o HPLC, base imprescindible para poder realizar dicho estudio de estabilidad.

En los años 95-97 se publicaron cartas, editoriales y artículos que cuestionaban la administración de la AnB-IL. Dado que al poco tiempo de su preparación, se observaba la aparición de unos precipitados amarillos con la consiguiente formación de partículas de tamaño $>10 \mu\text{m}$, que podían originar problemas de tromboembolismo asociados a su administración, los autores recomendaban la no utilización de esta forma farmacéutica (92-98). Posteriormente, un estudio de estabilidad química y de compatibilidad física visual de la AnB en suero glucosado al 5% y en Intralipid 20% a las concentraciones de 0.05 y 0.5 mg/mL, demostraban que ambas formulaciones eran estables durante 24 horas a la temperatura de 23-25°C con o sin protección de la luz (99). Otro estudio publicado en el año 98, aconsejaba sólo la administración de la AnB-IL cuando la proporción del lípido en la formulación administrada era inferior al 30% (100).

Actualmente, debido a la polémica sobre la estabilidad de la AnB-IL, en la práctica hospitalaria se administra la AnB en formulaciones lipídicas comercializadas. No obstante, a pesar de no aconsejarse la administración de la AnB-IL, se han publicado estudios comparativos y no comparativos de eficacia, tolerancia, farmacocinética y toxicidad tanto en adultos como en niños (101-105).

1.10 AnB en solución acuosa para inhalación

La aspergilosis pulmonar invasiva se desarrolla a partir de las esporas inhaladas procedentes del medio que rodea el paciente. Se han estudiado diversas formas para prevenir esta patología, aunque hasta finales de los años 80, no se describió el uso de AnB por vía inhalada e intranasal (106). La utilización de AnB inhalada se basa en el hecho de que el origen de la infección es la colonización oportunista de las fosas nasales, los senos paranasales y el tracto respiratorio superior (76).

Los estudios realizados en modelos animales revelan que la AnB inhalada disminuye tanto la aparición (profilaxis) como la progresión (tratamiento local) de las infecciones pulmonares por hongos del género *Aspergillus spp.*, retrasando la mortalidad de forma significativa. La ventaja fundamental radica en que las concentraciones en pulmón son suficientemente eficaces -superiores a las alcanzadas por vía endovenosa- mientras que en el resto de los tejidos son inapreciables (40-43).

La mayoría de los estudios con AnB intranasal o inhalada se han realizado en pacientes leucémicos que presentan neutropenia transitoria debido al tratamiento citostático o en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea. Hasta mediados de los años 90, los estudios controlados en pacientes sometidos a trasplante de otros órganos -como el de pulmón- eran escasos (107).

Los primeros datos de la utilización de AnB inhalada en humanos datan de la décadas de los años setenta y ochenta. En estos trabajos se han observado resultados satisfactorios en pacientes con coccidiomicosis (37), candidiasis broncopulmonar (38)

y aspergilosis pulmonar invasiva (39). A partir de entonces se han realizado más estudios con resultados positivos frente a estas infecciones fúngicas pulmonares (44-54).

En un estudio realizado en 29 pacientes con el fin de determinar la posible toxicidad de la AnB inhalada, se observó mayoritariamente la presencia de tos en todos los pacientes, debido -principalmente- al deoxicolato presente en la formulación. Así mismo, se describieron algunos casos de náuseas y vómitos. Ningún paciente desarrolló disnea o alteraciones de la función renal (47).

Los parámetros farmacocinéticos de la AnB inhalada están relacionados con el tamaño de partícula que se obtiene tras nebulizar la solución que contiene el fármaco (44,48). En modelos animales se ha demostrado que la AnB se acumula en el tejido pulmonar alterando su comportamiento cinético de forma que la semivida de eliminación es mayor, requiriéndose regímenes de dosificación espaciados (108). Las dosis utilizadas en la mayoría de estudios oscilan entre 5-10 mg administrados cada 8-12 horas.

La AnB administrada de forma inhalada se ha mostrado como un tratamiento eficaz y seguro en la profilaxis de la aspergilosis pulmonar invasiva (76,106). Es importante destacar que hasta los mediados de los años 90, los estudios publicados eran escasos y agrupaban a un número pequeño de pacientes, por lo que hacían falta más estudios prospectivos para poder confirmar su utilización (41,76,106). En base a los resultados obtenidos en pacientes neutropénicos, empezó a utilizarse en trasplante pulmonar, en los cuales una aspergilosis pulmonar invasiva significa una complicación añadida a la evolución de su estado.

La solución acuosa de AnB para inhalación constituye una forma de administración de uso tópico que puede utilizarse tanto a nivel intra como extrahospitalario. Numerosos son los pacientes que en régimen ambulatorio reciben este tratamiento después de una etapa de ingreso en hospital por algunas de las patologías mencionadas anteriormente. Las únicas referencias publicadas hasta mediados de los años 90 sobre la estabilidad del deoxicolato sódico de AnB en solución acuosa, daban como

caducidad máxima 24 horas a temperatura ambiente y una semana refrigerado con protección de la luz (109) e incluso una semana al intervalo de temperatura de 5 a 23°C (110) cuando se prepara esta formulación para administración endovenosa. El incremento de pacientes trasplantados pulmonares en nuestro hospital que utilizaban esta forma de administración como profilaxis y tratamiento, planteó la necesidad de realizar un estudio de estabilidad a más largo plazo, con la finalidad de optimizar recursos y facilitar una mejora en la calidad de vida.

En la actualidad, la forma de administración de AnB en solución acuosa para inhalación es de primera elección en la profilaxis y tratamiento de la aspergillosis pulmonar invasiva en el paciente portador de trasplante de pulmón (54,67-69).

1.11 AnB inhalada en la profilaxis del trasplante de pulmón

El paciente portador de un trasplante pulmonar, además de inmunodeprimido, presenta una anastómosis isquémica de la vía aérea, dificultades con el aclaramiento mucociliar, abolición del reflejo tusígeno así como diversas complicaciones en su evolución. Todas estas circunstancias son factores de riesgo para las infecciones, en concreto las producidas por hongos filamentosos.

Las infecciones fúngicas en el trasplante pulmonar son una causa importante de morbilidad y mortalidad con una prevalencia que oscila entre el 20 y el 40% de los casos (111-114). Con el inicio del programa de trasplante pulmonar en nuestro hospital, a partir del año 1990, surgió la necesidad de introducir algún tipo de profilaxis para prevenir estas infecciones fúngicas asociadas al paciente inmunocomprometido. Los estudios que utilizaban como profilaxis AnB endovenosa a dosis bajas u otros fármacos antifúngicos imidazólicos no disminuían el riesgo de infección. En cambio, los estudios de profilaxis con AnB inhalada, tanto experimentales como clínicos en pacientes neutropénicos, mostraban buenos resultados (44-54).

A la vista de estos datos, se introdujo la profilaxis con AnB inhalada en los pacientes trasplantados pulmonares de nuestro centro. Se empezó a administrar a la dosis de 6

mg cada 8 horas con nebulizador CR60 durante los tres primeros meses y posteriormente una vez al día. La prevalencia por la infección por *Aspergillus spp.* disminuyó notablemente (115). Actualmente, con la experiencia de más de 100 trasplantes de pulmón, y ante la eficacia clínica demostrada, se considera como el tratamiento profiláctico de primera elección.

En el año 1995, y con la experiencia en la utilización de AnB inhalada, se planteó si las dosis y los intervalos de dosificación que se estaban usando habitualmente eran los más adecuados, ya que hasta esa fecha sólo se disponían de estudios de eficacia clínica. La farmacocinética en secreciones respiratorias y la distribución en el árbol pulmonar eran desconocidas en los pacientes con trasplante pulmonar. Únicamente existía un estudio previo de la distribución de la AnB nebulizada en 40 pacientes neutropénicos y 4 voluntarios sanos en el que se demostraba una buena distribución pulmonar del fármaco marcado previamente con Tecnecio (49).

En base a los resultados obtenidos en el tratamiento de la AnB nebulizada por vía inhalatoria, se planteó la realización de un estudio farmacocinético como evidencia científica a la eficacia clínica demostrada. La hipótesis del estudio era la distribución homogénea de la AnB nebulizada en tejido pulmonar, y a diferencia de la administración parenteral, elevadas concentraciones del fármaco en los productos respiratorios y escaso paso al torrente sanguíneo.

Es importante resaltar el elevado coste económico del tratamiento debido a la alta prevalencia de la enfermedad, a su larga duración y a la necesidad de usar formas lipídicas de AnB endovenosa para disminuir la nefrotoxicidad. Desde este punto de vista la introducción de una profilaxis eficaz representa un importante ahorro sin disminuir la calidad de atención al paciente.

En 1995, le fue concedida una ayuda al grupo de trasplante de pulmón de nuestro hospital por parte del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), de 2 años de duración, para realizar el estudio de la farmacocinética y distribución de la AnB inhalada como

profilaxis, en el paciente portador de trasplante de pulmón. Dada la inexistencia de métodos estandarizados para la determinación de AnB en muestras respiratorias, fue necesario desarrollar una técnica específica para la cuantificación de AnB en broncoaspirado y lavado broncoalveolar (BAS y BAL).

Posteriormente y a partir de 1995, se han referenciado más estudios de la disposición de la AnB nebulizada para tratar la aspergilosis pulmonar (116,117).

Se ha realizado un estudio sobre la distribución de la AnB nebulizada marcada con Tecnecio-99 comparando la eficacia de tres tipos de nebulizadores según el tamaño de partícula; también se determinó las concentraciones séricas obteniendo unos resultados inferiores a 25 ng/mL, prácticamente indetectables, que se correlaciona con la elevada distribución en pulmón (116). En otro estudio los autores evalúan la dosis de AnB a administrar en 20 pacientes adultos con varios tipos de nebulizadores en diferentes regiones del tracto respiratorio y obtienen como resultado que se puede administrar hasta concentraciones de 10 mg/mL de AnB sin problemas de toxicidad (117).

Estudios más recientes relacionan la eficacia clínica con la administración de esta forma farmacéutica en pacientes portadores de trasplante de pulmón (67-69), y otros realizan una evaluación farmacocinética de AnB nebulizada en tejido pulmonar (118).

1.12 Métodos de determinación de la AnB

Los métodos para determinar AnB son: microbiológicos o bioensayos y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La diferencia fundamental entre ambos métodos es que el bioensayo determina la actividad biológica del fármaco mientras que la cromatografía determina su concentración.

Los métodos microbiológicos pueden realizarse *in vitro* por difusión radial en geles o *in vivo* en animales; en ambos casos se utilizan como test cepas de *Candida albicans* o de *Paecilomyces variotii* (26,100,119). Son técnicas de bajo coste que presentan una variabilidad analítica elevada (120) y por ello, han sido desplazados por los métodos cromatográficos.

Hasta el año 1995, fecha en que se publicó el primer trabajo de esta memoria, se han descrito numerosos métodos para determinar concentraciones de AnB por HPLC, que varían en función de las condiciones cromatográficas fijadas: tratamiento de la muestra previo al análisis cromatográfico, tipo de columna, fase móvil, volumen de muestra inyectada, longitud de onda y tipo de detector. Estas técnicas de cromatografía datan de finales de los años setenta debido a la antigüedad de la AnB convencional comercializada y se han estandarizado para cuantificarla en diferentes soluciones (87-91) y en muestras biológicas humanas y animales (plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo y tejidos de distintos órganos) (108,119-135), con aplicación a estudios de estabilidad y farmacocinética.

Posteriormente, se han referenciado más trabajos en la literatura sobre métodos de cuantificación de la AnB por HPLC (136-142).

En la tabla 3 se resumen algunos de los métodos referenciados con las características metodológicas y prestaciones de los mismos. En base a éstos se desarrolló la técnica de determinación de la AnB en suero humano.

Métodos desarrollados por:

- 1- Chow et al (108)
- 2- Wang et al (131)
- 3- Brassinne et al (129)
- 4- Hütsewede et al (119)
- 5- Granich et al (120)

Tabla 3. Métodos de determinación de AnB por HPLC

LONGITUD DE ONDA	COLUMNA	PRECOLUMNA	FASE MÓVIL	ESTÁNDAR INTERNO	PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN	TIEMPO RETENC.
405 nm (1)	ODS-3 5µm 125 mm x 5 mm ID	NO	Tampón Na ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄ 1.6 mM, acetonitrilo (63/37, v/v) pH=7 Flujo 1.5 mL/min	1-Amino-4-Nitro- naftaleno	Precipitación proteínas séricas con metanol (leva incorporado el estándar interno). Centrifugación. Inyección directa del sobrenadante	3.5 min
382 nm (2)	µBONDAPACK C ₁₈ 10 µm 300 mm x 3.9 mm ID	NO	Na ₂ EDTA 2.5 mM, Acetonitrilo (55/45, v/v) Flujo 1 mL/min	NO	Extracción en fase sólida con cartuchos Bond-Elut C ₁₈ . Elución con acetonitrilo, Na ₂ EDTA 2.5 mM (60/40, v/v). Inyección del eluido	6-7 min
405 nm (3)	µBONDAPACK C ₁₈ 10 µm 300 mm x 3.9 mm ID	VYDAC-201RP 30-40 µm 50 mm x 3.9 mm ID	Acetonitrilo, 2.5 mM EDTA, metanol (30:20:50, v/v/v) Flujo 1.6 mL/min	NO	Precipitación proteínas séricas con metanol. Centrifugación. Inyección directa del sobrenadante	4 min
405 nm (4)	LICHROSPHER 100 5 µm 250 mm x 4 mm ID	NO	Metanol, tampón fosfato (10 mM KH ₂ PO ₄ , 5 mM EDTANa ₂ , pH=4) (80:20, v/v) Acetonitrilo, tampón fosfato (10 mM KH ₂ PO ₄ , 5 mM EDTANa ₂ , pH=4) (40:60, v/v)	1-Amino-4 Nitro- naftaleno	Precipitación proteínas séricas con metanol (leva incorporado el estándar interno). Centrifugación. Inyección directa del sobrenadante	6.8±0.5 min 8.4±0.5 min
382 nm (5)	µBONDAPACK C ₁₈ 10 µm 300 mm x 3.9 mm ID	NO	EDTA 0.01 M, acetonitrilo (60/40, v/v) pH=4.2 Flujo 1.5 mL/min	1-Amino-4-Nitro- naftaleno N-acetil- anfotericina B	Si bilirrubinas < 3 mg/dL: Precipitación proteínas séricas con metanol. Centrifugación. Inyección directa del sobrenadante Si bilirrubinas > 3mg/dL: Precipitación proteínas séricas con metanol. Extracción en fase sólida con columna SuperClean C ₁₈ (vac 1cc) del sobrenadante. Elución con metanol e inyección del eluido	4.9±0.8 min

2. OBJETIVOS

La AnB es el fármaco de elección para un gran número de infecciones fúngicas, tal como se ha revisado en el apartado 1.6 de la introducción. Su utilización, sin embargo, conlleva un elevado riesgo de toxicidad, fundamentalmente renal.

Los efectos adversos de la AnB se han relacionado habitualmente con su forma de administración parenteral convencional (solución acuosa de sal sódica de deoxicolato sódico diluida en suero glucosado al 5%).

Desde finales de la década de los años ochenta se han intentado desarrollar nuevas formas farmacéuticas que mejoren su eficacia y seguridad. El carácter lipófilo de la molécula sugirió la posibilidad de administrarla en emulsiones lipídicas o encapsulada en liposomas (AnB liposomal). En una primera etapa, el elevado coste de las formulaiones lipídicas y su falta de comercialización conllevó, en la práctica hospitalaria, al uso de la solución lipídica (AnB en *INTRALIPID*[®] 20%), aunque actualmente se utiliza más los preparados comerciales en vehículo lipídico o en liposomas. Uno de los problemas que planteaba su utilización era la falta de estudios sobre la estabilidad química de esta nueva formulación preparada *in situ*.

La solución acuosa de AnB inhalada se ha mostrado eficaz en la profilaxis de la aspergilosis pulmonar invasiva, que representa una de las complicaciones más importantes en los pacientes sometidos a trasplante pulmonar. El preparado acuoso de AnB para inhalación es una forma de administración que se utiliza de manera general, tanto a nivel de pacientes hospitalizados como en régimen ambulatorio. Sin embargo, a pesar de su eficacia clínica demostrada, no existían datos publicados de la farmacocinética y distribución pulmonar de este preparado que se correlacionaran científicamente con dicha eficacia.

Los objetivos de este trabajo son:

- 1) Adaptación de una técnica para la determinación de concentración de AnB por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y validación de sus

prestaciones analíticas en suero, secreciones respiratorias (broncoaspirado o BAS y lavado broncoalveolar o BAL) y emulsión lipídica (*AnB-INTRALIPID*[®] 20%).

- 2) Estudio de estabilidad química de AnB en la forma de administración como emulsión lipídica (*AnB-INTRALIPID*[®] 20%).
- 3) Aplicación a estudios farmacocinéticos de anfotericina B administrada en diferentes formas de preparación.

3. MATERIAL E INSTRUMENTACION

3.1 Estándares y reactivos

La calidad analítica y la procedencia de los estándares y reactivos empleados fue la siguiente:

- Estándar de AnB (Fungizona): Squibb & Sons.
- Acetonitrilo lichrosolv (CH₃CN): Merck.
- Metanol lichrosolv y para análisis (CH₃OH): Merck.
- Acido acético glacial 100% para análisis (CH₃COOH): Merck.
- Etilendiamintetracetato disódico dihidratado (Na₂EDTA.2H₂O): Merck.
- Dimetilsulfóxido (C₂H₆SO): Sigma Chemical Co.
- Acetato sódico trihidratado (NaC₂H₂O₂.3H₂O): Sigma Chemical Co.
- Cloroformo (CLCH₃): Carlo Erba.
- Hidróxido sódico para análisis (NaOH): Merck.
- Ácido clorhídrico 35% para análisis (HCl): Merck.
- Tween 80: Acofarma.
- Intralipid 20% : Kabbi Pfrimmer (lote I-008).
- Suero fisiológico (CINa): Grifols (lote J-270) .
- Agua estéril para inyección: Braun (lote 000).
- Agua destilada: purificación a través de Milli-Q Plus, de Waters Millipore Corporation.

3.2 Material

- Columna C₁₈ de fase reversa de 30 mm x 4.6 mm ID y 3 μm de tamaño de partícula (Perkin-Elmer).
- Columna Sep-Pak C₁₈ de fase reversa, vacío, 3cc, 500 mg para extracción en fase sólida (Waters).
- Equipo de filtración Supelco formado por recipiente de vidrio de 250 mL como base para un embudo esmerilado 34/45, erlenmeyer de 1000 mL 34/45, tapón de vidrio, pinza y rejilla con volanderas de teflón (Teknokroma).
- Pipetas automáticas de volumen variable: 5-40 μL, 40-200 μL y 100-1000 μL (Nirco).

- Filtros de fase móvil de 47 mm y 0.45 µm de tamaño de poro (Waters).
- Viales de fondo cónico para inyector automático formados por: viales STVG Chromacol de 1.1 mL, tapón de rosca 8-SC Chromacol y discos 8-ST 14 Chromacol (Teknokroma).
- Tubos de polivinilo de tapón de rosca y fondo cónico con capacidad de 50 mL (Nirco).
- Tubos de vidrio de 4 mL para recogida de eluato (Nirco).
- Tubos de vidrio para tapón de rosca de 10 mL (Nirco).

3.3 Especímenes

- *Suero*: pool de suero procedente de muestras de Banco de Sangre de nuestro hospital no hemolizadas ni ictericas.
- *Broncoaspirado*: pool de las secreciones obtenidas en el broncoaspirado procedentes de pacientes portadores de trasplante de pulmón que no toman AnB.
- *Lavado broncoalveolar*: pool de las secreciones obtenidas en el lavado broncoalveolar procedentes de pacientes portadores de trasplante de pulmón que no toman AnB.

3.4 Equipo de cromatografía

El análisis cromatográfico se realizó en un equipo Kontron Instruments (Milan, Italia). Este equipo consta de un sistema de bombeo triple modelo 325, un muestreador automático con volumen de inyección variable modelo 465 y un detector ultravioleta/visible modelo 432 con una célula de flujo 8 µL.

Los datos analíticos fueron procesados por el programa informático: Kontron Data System 450 Multitasking, versión 3.4 (A) y PC-Integrator, versión 3.0 en un ordenador Acer View 31 e impresora Epson LQ-570. El programa integra automáticamente los picos cromatográficos con posibilidad de modificación manual y permite la elaboración de curvas de calibración por regresión lineal o

cuadrática mediante el área o altura de los picos, el cálculo de concentraciones de las muestras por interpolación en la curva de calibración y el almacenamiento de los cromatogramas.

3.5 Espectrofotómetro

El espectro de absorción de la AnB se realizó en un espectrofotómetro Uvikon 860 de Kontron Instruments (Milan, Italia), con un intervalo de medida 180-900 nm, lámparas de cuarzo-halógeno (290-900 nm) y deuterio (180-370 nm) y un fotomultiplicador R 928.

3.6 Otros equipos

- Agitador magnético Nuova II Stir plate (Sybron Thermolyne).
- Agitador mixer Mixo-Tub (Gri-cel).
- Agitador Vibromatic (P Selecta) .
- Equipo de vacío VAC-ELUT (Analytichen International).
- pHmetro 92 LabpHmeter (RadioMeter Copenhagen).
- Microcentrífuga TD_x centrifugeTM 10500 g (Abbott Diagnostics Division)
- Centrífuga Spinchron Beckman.
- Centrífuga Kokusan H-103N series.
- Congelador -20°C Liebher.
- Congelador -80°C Nuaire.
- Congelador -80°C Sanyo Ultralow.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 DETERMINACIÓN DE ANFOTERICINA B EN SUERO

“Determination of amphotericin B in human serum by liquid chromatography”

López R, Pou L, Pascual C.

Journal of Chromatography B 1995; 674: 298-300

4.1.1 Metodología experimental

4.1.1.1 Preparación de soluciones estándares y calibradores

- *Solución stock*: dilución de 50 mg de AnB (Fungizona®) en 10 mL de agua estéril para inyección; concentración 5mg/mL. Se congela a -80°C.
- *Estándar acuoso intermedio*: 100 μ L de la solución stock se diluyen hasta 10 mL con agua destilada; concentración 50 μ g/mL. Se prepara en el mismo día de procesar una serie analítica.
- *Estándares metanólicos*: a partir del estándar intermedio 50 μ g/mL se preparan los siguientes estándares de trabajo con metanol 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 y 5 μ g/mL. Se utiliza metanol en vez de agua destilada para que muestras y estándares se procesen con la misma matriz (desproteización de las muestras séricas con metanol). Estos estándares se preparan en el mismo día de procesar una serie analítica.
- *Calibradores séricos*: a partir del estándar intermedio 50 μ g/mL, se adiciona AnB a un "pool" de sueros libre del fármaco para obtener las siguientes concentraciones 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 y 5 μ g/mL. Se congelan a -80°C hasta el momento de su análisis.

4.1.1.2 Pretratamiento de las muestras

El pretratamiento de las muestras se realizó en base al método descrito por Brassinne et al (135): precipitación de las proteínas del suero con metanol. Las muestras y calibradores séricos fueron desproteinizados añadiendo 600 μ L de metanol a 200 μ L de suero, se homogenizaron en agitador mixer 30 segundos y posterior centrifugación en microcentrífuga a 10000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante libre de proteínas fue inyectado por duplicado directamente en la columna del cromatógrafo.

4.1.1.3 Condiciones cromatográficas

- Fase móvil: Acetonitrilo/EDTANa₂ 2.5 mM (30/70 v/v).
- Columna: 30 mm x 4.6 mm I.D. Perkin-Elmer C₁₈ 3 μm tamaño partícula.
- Volumen de muestra: 80 μL.
- Inyección de las muestras y estándares por duplicado.
- Condiciones de detección:
 - Longitud de onda: 405 nm
 - Sensibilidad del detector: 0.02 AUFS.
- Tiempo de cromatograma: 3 minutos
- Acondicionamiento de la columna previo al análisis:
 - Fase móvil: 30 minutos a flujo 1 mL/min.
- Regeneración de la columna después de una serie analítica:
 - Agua: 20 minutos a flujo 1 mL/min.
 - Acetonitrilo: 20 minutos a flujo 1 mL/min.
 - Acetonitrilo/agua (70/30 v/v): 20 minutos a flujo 1 mL/min.

4.1.1.4 Recuperación

La recuperación se calculó comparando el área del pico de la AnB de los estándares séricos (0.5, 1, 2.5 y 5 μg/mL) con el de soluciones metanólicas de concentración equivalente. Las muestras fueron procesadas cinco veces (n=5) en series analíticas distintas.

4.1.1.5 Linealidad

Se estudió la linealidad del método desde concentraciones de 0.05 μg/mL (AUFS 0.005) hasta 25 μg/mL (AUFS 0.2). Se realizó un análisis de regresión lineal para el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.05 y 1.25 μg/mL (AUFS 0.005) y otro análisis de regresión para el intervalo de concentraciones comprendido entre 2.5 y 25 μg/mL (AUFS 0.2), utilizando el programa informático STAT GRAPHICS, versión 3.1.

4.1.1.6 Imprecisión intraserial

Se determinó analizando 10 veces dentro de la misma serie analítica, dos muestras, una de concentración de AnB de 0.5 µg/mL y otra de 2.5 µg/mL, preparadas a partir de un "pool" de sueros al cual le fue adicionado el fármaco.

4.1.1.7 Imprecisión interserial

Se evaluó determinando una vez al día durante 10 días dos muestras procedentes del "pool" anteriormente citado y conservados a -80°C.

4.1.1.8 Curva de calibración y cálculo de resultados

La curva de calibración se calculó por regresión lineal a partir de las áreas de los picos correspondientes a los estándares, procesados en cada serie analítica. La concentración de las muestras se obtuvo por interpolación de su área en la recta de calibración.

4.1.2 Resultados y discusión

4.1.2.1 Estandarización de las condiciones cromatográficas

En este estudio se presenta un método de determinación de AnB en suero humano por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa y columna corta (30 mm). El desarrollo y puesta a punto de la técnica se realizó en base a los métodos de determinación de AnB por HPLC previamente descritos y resumidos en la tabla 3 de la página 35. Para ello, se escogió una columna de octadecilsilano (C₁₈), más corta (30 mm x 4.6 mm ID) que en los métodos de referencia (125 a 300 mm) (108,119,120,129,131), con el fin de obtener tiempos de retención más pequeños y se utilizó la fase móvil del método descrito por Wang et al (131) (acetonitrilo y tampón EDTA) ya que no usa estándar interno y

presenta una buena sensibilidad. Debido a que, en los trabajos cromatográficos publicados, la detección de AnB se efectúa a 382 ó 405 nm, se realizó el espectro de absorción de una solución de AnB en fase móvil a la concentración de 10µg/mL en un intervalo de longitudes de onda de 290 a 450 nm para determinar los máximos de absorción, presentando mayor absorbancia a 405 nm. Por último, para la preparación de las soluciones estándares fue necesario utilizar la AnB de la formulación comercial (Fungizona), ya que el principio activo proporcionado por el laboratorio fabricante presentaba una estabilidad química de corta duración.

El tiempo de retención para la AnB fue de 1.5 minutos en las condiciones cromatográficas finales de trabajo descritas en el apartado 4.1.13, lo que representa una reducción importante en el tiempo de análisis y un bajo consumo de fase móvil respecto a los métodos publicados hasta ese momento cuyos tiempos de retención oscilan entre 3.5 y 10 minutos y utilizan columnas de 125 a 300 mm (87-91,108,119-135). Las técnicas de cromatografía referenciadas posteriormente en la literatura, a la publicación de este trabajo (136-142), no representan ninguna ventaja en cuanto a los tiempos de retención, oscilando éstos entre 5.5 y 14 minutos, ni en la utilización de columnas más cortas (el análisis cromatográfico se realiza con columnas de 100 a 300 mm) con respecto a nuestro método.

4.1.2.2 Pretratamiento de las muestras

En nuestro método, el pretratamiento de las muestras se realizó en base al método descrito por Brassinne et al (129) por parecer sencillo y rápido: precipitación de las proteínas del suero con metanol en una proporción 1/3 (v/v) respectivamente, centrifugación a 10.000 g durante 5 minutos e inyección del sobrenadante libre de proteínas directamente al cromatógrafo. Se analizó la concentración de proteínas en varias

alícuotas de sobrenadantes por el método de Biuret detectándose unas concentraciones entre 0.1 y 0.2 gr/dL, aceptables para inyección directa en cromatografía.

El método descrito por Granich et al (120) diferencia el pretratamiento de las muestras séricas en función de la concentración de bilirrubina en ellas. Se comprobó que, efectivamente, en muestras con bilirrubinas superiores a 3 mg/dL, después de desproteinización con metanol e inyección del sobrenadante, el cromatograma resultante a la adición de una concentración conocida de AnB presentaba una gran interferencia en el mismo tiempo de retención del fármaco. Este problema fue solucionado mediante extracción en fase sólida (120), estableciéndose el pretratamiento de las muestras con bilirrubina por separación con cartuchos SEP-PACK C₁₈, aunque en nuestro trabajo publicado, no se especifica la diferenciación en el pretratamiento por considerar que la incidencia de muestras con valores de bilirrubina superiores a 3 mg/dL, en las cuales se necesita cuantificar concentraciones de AnB en sangre, es relativamente baja.

Las técnicas de cromatografía líquida descritas en la bibliografía hasta la fecha de publicación de esta memoria, utilizan en el pretratamiento de las muestras, procedimientos de extracción en fase sólida (121,124,125,131) o técnicas de precipitación con metanol (108,119,120,122) o de precipitación con acetonitrilo (123,130), en todos los casos con y sin estándar interno. En nuestro método, la desproteinización de la muestra mediante precipitación con metanol constituye una técnica rápida y simple, y el sobrenadante obtenido puede inyectarse directamente en el cromatógrafo. El volumen de muestra de suero (200 µL) necesario para el pretratamiento, condiciona que también sea un método adecuado para cuantificar AnB en población pediátrica, ya que en algunas técnicas, el volumen es un factor limitante para su aplicación en este tipo de población, teniendo que ser adaptado el método.

4.1.2.3 Validación de las prestaciones analíticas

4.1.2.3.1 Recuperación

Los resultados de la recuperación del método se exponen en la siguiente tabla y se expresan como media \pm desviación estándar ($X \pm SD$) (n=5):

<u>Concentración ($\mu\text{g/mL}$)</u>		<u>Recuperación (%)</u>
<u>Añadida</u>	<u>Encontrada</u>	
0.5	0.47 \pm 0.05	94.76 \pm 9.71
1.0	0.87 \pm 0.05	87.14 \pm 5.02
2.5	2.24 \pm 0.18	89.58 \pm 7.24
5.0	4.46 \pm 0.22	89.18 \pm 4.54

La recuperación del método es superior al 87%, para todos los niveles de concentración estudiados. Los métodos que utilizan estándar interno obtienen recuperaciones cercanas al 90% (108,119,120,122-124,130), de forma que nuestros resultados justifican que no se utilice estándar interno en la técnica. Ello implica una mayor simplificación en el método analítico.

4.1.2.3.2 Linealidad

Para el intervalo de concentraciones de estándares séricos de AnB comprendido entre 0.05 y 1.25 $\mu\text{g/mL}$ (AUFS 0.005) la recta de regresión fue: $Y(\text{área}) = 150.542 X(\text{concentración}) - 0.124783$ ($r = 0.99983$, $p < 0.00001$). El error estándar del estimado fue 1.45358 y los errores estándar para la ordenada en el origen y la pendiente fueron 0.799505 y

1.24147 respectivamente.

Para el intervalo de concentraciones de estándares séricos de AnB comprendido entre 2.5 y 25 $\mu\text{g/mL}$ (AUFS 0.2) la recta de regresión fue: $Y(\text{área}) = 3.91805 X(\text{concentración}) + 21.02723$ ($r = 0.999768$, $p < 0.00001$). El error estándar del estimado fue 0.943354 y los errores estándar para la ordenada en el origen y la pendiente fueron 0.740798 y 0.0487146 respectivamente.

Los resultados de la linealidad muestran que la técnica es aceptable (0.05 a 25 $\mu\text{g/mL}$), ya que abarca las concentraciones séricas que se alcanzan después de la administración de la dosis recomendada de AnB e incluso dosis superiores (10).

4.1.2.3.3 Imprecisión intraserial

Los resultados de la imprecisión intraserial del método se exponen en la siguiente tabla:

<u>Concentración ($\mu\text{g/mL}$)</u>				
<u>Teórica</u>	<u>Media</u>	<u>SD</u>	<u>Intervalo</u>	<u>CV(%)</u>
0.5	0.43	0.01	0.42 - 0.46	2.40
2.5	2.23	0.08	2.10 - 2.28	1.33

La imprecisión intraserial del método no supera el 2.40% para los dos niveles de concentración estudiados. Estos resultados son aceptables e inferiores a los obtenidos en los métodos descritos con tratamiento de muestra y condiciones cromatográficas semejantes (superior a 4.80%) (119,120,129). En técnicas referenciadas posteriormente a la publicación de este trabajo, la imprecisión intraserial oscila entre 0.5% y 6.7%

(139,140,142), de manera que, nuestros resultados siguen teniendo buena aceptabilidad.

4.1.2.3.4 Imprecisión interserial

Los resultados de la imprecisión interserial del método se exponen en la siguiente tabla:

<u>Teórica</u>	<u>Concentración (µg/mL)</u>				<u>CV(%)</u>
	<u>Media</u>	<u>SD</u>	<u>Intervalo</u>		
0.5	0.46	0.02	0.44 - 0.49		3.61
2.5	2.56	0.09	2.45 - 2.70		3.60

La imprecisión intraserial máxima del método es del 3.61% para los dos niveles de concentración estudiados. Estos resultados son aceptables e inferiores a los obtenidos en los métodos descritos con tratamiento de muestra y condiciones cromatográficas semejantes (superior a 4.8%) (119,120,129). En técnicas referenciadas posteriormente a la publicación de este trabajo, la imprecisión interserial oscila entre 1.02% y 13.93% (138-140,142), de manera, que nuestros resultados siguen teniendo buena aceptabilidad.

En general, el uso de columnas cortas (30 mm x 4.6 mm ID) presenta una serie de ventajas: rápido equilibrio, menor tiempo de retención, y bajo consumo de fase móvil, respecto a los métodos publicados. Estos factores son importantes en la evaluación de la practicabilidad de esta técnica. Por otra parte, aunque la sensibilidad de nuestro método no es tan alto como en otras técnicas referenciadas (134,135), es suficiente para la monitorización de las concentraciones séricas de AnB que se alcanzan en el intervalo de dosificación.

4.2 ESTABILIDAD DE ANFOTERICINA B EN INTRALIPID® 20%

“Stability of amphotericin B in an extemporaneously prepared i.v. fat emulsion”

López RM, Ayestarán A, Pou L, Montoro JB, Hernández M, Caragol I.

Am J Health-Syst Pharm 1996; 53:2724-27.

4.2.1 Metodología experimental

4.2.1.1 Preparación de soluciones estándares y calibradores

- *Solución stock* dilución de 50 mg de AnB (Fungizona[®]) en 10 mL de agua estéril para inyección; concentración 5mg/mL. Se congela a -80°C.
- *Estándar acuoso intermedia* 100 μ L de la solución stock se diluyen hasta 10 mL con agua destilada; concentración 50 μ g/mL. Se prepara en el mismo día de procesar una serie analítica.
- *Estándares metanólicos* a partir del estándar intermedio 50 μ g/mL se preparan los siguientes estándares de trabajo con metanol 1, 2.5, 5, 10 y 20 μ g/mL. Se utiliza metanol en vez de agua destilada para que muestras y estándares se procesen con la misma matriz (reconstitución del eluato obtenido de la extracción del fármaco de la matriz lipídica con metanol). Estos estándares se preparan en el mismo día de procesar una serie analítica.

4.2.1.2 Preparación y pretratamiento de las muestras

4.2.1.2.1 Preparación

Las mezclas de AnB en la emulsión lipídica (Intralipid[®] 20%) fueron preparadas asépticamente en campana de flujo laminar horizontal en frascos estériles de vacío con capacidad de 100 mL a las concentraciones de 0.5, 1 y 2 mg/mL añadiendo 10, 20 y 40 mL de la solución stock de AnB de 5 mg/mL a 90, 80 y 60 mL de Intralipid[®] 20% respectivamente.

Las muestras fueron preparadas por triplicado, utilizando para cada concentración tres lotes distintos de AnB (Fungizona[®]) (lotes H-011, I-001, I-002, I-003, I-004 y I-005) y en diferentes condiciones de temperatura: T^a ambiente sin protección de la luz, T^a ambiente con protección de la luz y refrigerada (4-8°C) protegidas de la luz.

Se extrajeron alícuotas de 8 mL de muestra de cada frasco al tiempo 0, 4, 12 y 24 horas y a los 2, 4, 7 y 15 días para el análisis cuantitativo de la AnB y evaluación visual de los cambios físicos. Estas muestras fueron inmediatamente congeladas a -80°C hasta su análisis.

Se extrajeron alícuotas de 2 mL de cada frasco de AnB de 1 y 2 mg/mL para cada condición de temperatura estudiada al tiempo 0 y a los 7 y 15 días para la determinación inmediata de la distribución del tamaño de partícula.

En el apartado 4 de resultados sólo se exponen los obtenidos del análisis químico.

4.2.1.2.2 Pretratamiento para el análisis cuantitativo

El procedimiento de extracción del fármaco se realizó mezclando a partes iguales en un tubo de vidrio con tapón de rosca, 5 mL de muestra (AnB-IL) con igual volumen de solución Tween 80 al 2% en suero salino fisiológico, según el método descrito por Sabin P et al para romper micelas (143). Se homogeneizó durante 1 hora en agitador tipo Vibromatic a T^a ambiente. Posteriormente a la rotura de la emulsión, se traspasó 5 mL a un segundo tubo y se adicionó el mismo volumen de cloroformo/metanol (1:1, v/v). Se agitó fuertemente y se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos a T^a ambiente. Se obtuvo dos fases transparentes y una interfase sólida de color amarillo que contenía el fármaco. Esta interfase amarilla se redisolvió con 5 mL de dimetilsulfóxido/metanol (1:1, v/v). La solución fue diluida con metanol para obtener una concentración teórica aproximadamente de AnB de 12 µg/mL y fue inyectada directamente y por duplicado en el cromatógrafo:

- 0.5 mg/mL dilución 1/20
- 1.0 mg/mL dilución 1/40
- 2.0 mg/mL dilución 1/80

4.2.1.2.3 Interferencias en el análisis cuantitativo

Soluciones acuosas de AnB a la concentración de 5µg/mL fueron expuestas a las condiciones de hidróxido sódico 1N (NaOH) (pH 12) y de ácido clorhídrico 5N (HCL) (pH 2) durante 20 horas a 85°C, para confirmar que los productos de degradación de la AnB no interfieren en el análisis cromatográfico.

4.2.1.3 Condiciones cromatográficas

- Fase móvil: Acetonitrilo/EDTANa₂ 2.5 mM (30/70, v/v).
- Columna: 30 mm x 4.6 mm I.D. Perkin-Elmer C₁₈, 3 μm tamaño partícula.
- Volumen de muestra: 20 μL.
- Inyección de las muestras y estándares por duplicado.
- Condiciones de detección:
 - Longitud de onda: 405 nm
 - Sensibilidad del detector: 0.05 AUFS.
- Tiempo de cromatograma: 3 minutos
- Acondicionamiento de la columna previo al análisis:
 - Fase móvil: 30 minutos a flujo 1 mL/min.
- Regeneración de la columna después de una serie analítica:
 - Agua: 20 minutos a flujo 1 mL/min.
 - Acetonitrilo: 20 minutos a flujo 1 mL/min.
 - Acetonitrilo/agua (70/30 v/v): 20 minutos a flujo 1 mL/min.

4.2.1.4 Recuperación

La recuperación se calculó comparando el área del pico de la AnB previo tratamiento del fármaco en la emulsión lipídica respecto a una solución metanólica preparada a una concentración de 12 μg/mL. Las muestras fueron procesadas cinco veces (n=5) en series analíticas distintas.

4.2.1.5 Imprecisión intraserial

Se determinó analizando 10 veces dentro de la misma serie analítica, una muestra a una concentración de AnB de 12 μg/mL, partiendo de una emulsión lipídica con el fármaco de 1 mg/mL.

4.2.1.6 Imprecisión interserial

Se determinó analizando la muestra anterior 5 veces en series analíticas diferentes. Las muestras fueron preparadas en el momento de su análisis.

4.2.1.7 Estabilidad

Se calculó en función del porcentaje de concentración de AnB encontrada con respecto a la concentración inicial a tiempo cero. Para ello, los resultados se expresaron en porcentajes de recuperación (%) calculados a partir del valor medio de las tres concentraciones obtenidas por muestra (correspondientes a cada uno de los tres lotes para cada serie de AnB-IL y preparada a las tres concentraciones de 0.5, 1 y 2 mg/mL), teniendo en cuenta la dilución efectuada en el pretratamiento para su análisis cromatográfico, y en las diferentes condiciones de temperatura. Se considera no estable a partir del 10% de descenso en la concentración encontrada con respecto a la inicial (144). Las muestras se prepararon tal como se explica en el apartado 4.2.1.2.1.

4.2.1.8 Curva de calibración y cálculo de resultados

La curva de calibración se calculó por regresión lineal a partir de las áreas de los picos correspondientes a los estándares, procesados en cada serie analítica. La concentración de las muestras se obtuvo por interpolación de su área en la recta de calibración.

4.2.2 Resultados y discusión

En este trabajo se presenta una adaptación del método de determinación de AnB en suero humano por HPLC, y su posterior validación en un excipiente graso, con aplicación directa a un estudio de estabilidad química en una formulación lipídica.

La AnB en emulsión lipídica (AnB-IL) constituyó una terapia alternativa a la administración

convencional (suero glucosado al 5%), antes de la comercialización de las formulaciones lipídicas, tal como se comenta en el apartado 1.9 de la introducción, debido a que, la tolerancia del fármaco era mejor y la incidencia de efectos adversos menor, aunque los estudios publicados concluían que la eficacia clínica era semejante con ambos preparados.

Uno de los problemas que planteaba la utilización de AnB-IL era la falta de datos publicados sobre su estabilidad química, por lo que la administración era de uso inmediato a su preparación. Era de gran interés, en su momento, debido a la importancia que supuso esta formulación en la práctica clínica, disponer de datos que constataran la estabilidad para facilitar la labor de su preparación y administración.

4.2.2.1 Adaptación de las condiciones cromatográficas

Basándonos en la técnica estandarizada en suero humano, las condiciones cromatográficas fijadas fueron las mismas que las descritas para muestras séricas, con la excepción del volumen de inyección (20 μ L) y la sensibilidad del detector (AUFS 0.05), ya que la dilución final de las muestras de trabajo se prepararon a una concentración mayor (12 μ g/mL) que el calibrador sérico más alto (5 μ g/mL) y no era necesario utilizar más sensibilidad en el método.

4.2.2.2 Pretratamiento de las muestras

Dado que en la bibliografía no se encontraron referencias sobre pretratamiento de emulsiones lipídicas para métodos cromatográficos, éste presentó problemas para separar la AnB lipídica y obtener una recuperación y precisión de la técnica aceptables. Se probaron diversas condiciones de ensayo:

1º) Homogenización de AnB-IL con cloroformo/metanol (v/v) a partes iguales, centrifugación, obtención de una fase acuosa transparente y otra lipídica turbia. La recuperación de AnB en la fase acuosa resultó ser del 6%; también se comprobó que la emulsión lipídica sin fármaco no presentara interferencias en el mismo tiempo de retención de la AnB. Los resultados de este primer ensayo indicaron que la AnB quedaba retenida prácticamente en su totalidad en la fase lipídica y que la emulsión lipídica no presentaba interferencias en los cromatogramas de la

técnica.

2º) En el segundo ensayo se escogió el método descrito por Sabin et al (143) para romper micelas, que utiliza Tween 80 al 2% en suero salino fisiológico. Se homogeneizó la AnB-IL a partes iguales con cloroformo/metanol (v/v), se centrifugó y se obtuvo dos fases transparentes (acuosa y orgánica) y una interfase sólida. La recuperación de AnB en la fase acuosa fue inferior al 10% y en la orgánica no se detectó AnB.

3º) En este ensayo de procedimiento análogo al anterior, la recuperación de la interfase sólida se realizó con dimetilsulfóxido/metanol (v/v). Este procedimiento de tratamiento de muestra fue finalmente el más adecuado tal como se especifica en el apartado 4.2.1.2.2. Este tratamiento establece un método para la extracción de AnB en muestras lipídicas, lo que representa una novedad respecto a los métodos publicados.

4.2.23 Interferencias en el análisis cuantitativo

Se confirmó que los productos de degradación de la AnB no interferían en el análisis cromatográfico, ya que ningún pico nuevo aparecía en el mismo tiempo de retención del pico cromatográfico de la AnB.

4.2.2.4 Validación de las prestaciones analíticas

4.2.2.4.1 Recuperación

Los resultados de la recuperación del método se exponen en la siguiente tabla y se expresan como media \pm desviación estándar ($X \pm SD$) (n=5):

<u>Concentración ($\mu\text{g/mL}$)</u>		<u>Recuperación (%)</u>
<u>Añadida</u>	<u>Encontrada</u>	
12	11.11 \pm 0.39	92.61 \pm 3.11

4.2.2.4.2 Imprecisión intraserial

Los resultados de la imprecisión intraserial se exponen en la siguiente tabla:

<u>Concentración (µg/mL)</u>				
<u>Teórica</u>	<u>Media</u>	<u>SD</u>	<u>Intervalo</u>	<u>CV(%)</u>
12	11.23	0.16	11.07 – 11.60	1.40

4.2.2.4.3 Imprecisión interserial

Los resultados de la imprecisión interserial se exponen en la siguiente tabla:

<u>Concentración (µg/mL)</u>				
<u>Teórica</u>	<u>Media</u>	<u>SD</u>	<u>Intervalo</u>	<u>CV(%)</u>
12	11.46	0.23	11.16-11.89	2.00

4.2.2.5 Estabilidad

En la tabla 4 se muestran los resultados de los cambios de concentraciones de las muestras de AnB en Intralipid 20%, expresados en porcentajes (%) respecto al valor basal (tiempo 0) a las diferentes condiciones de temperatura y concentración preparadas.

La AnB-IL a la concentración de 0.5 mg/mL fue estable una semana en todas las condiciones de ensayo del estudio. A las dos semanas, este preparado estaba por debajo del 12% a T^a ambiente (20-25°C) con y sin protección de la luz, y del 10% en la condición de refrigeración (4-8°C) del valor basal.

La estabilidad de la AnB-IL fue similar a las concentraciones preparadas de 1 y 2 mg/mL. La AnB fue estable cuatro días a T^a ambiente (20-25°C) sin proteger de la luz, y 1 semana a T^a ambiente (20-25°C) con protección de la luz y refrigerada (4-8°C). La media de concentraciones de AnB a la semana del ensayo en contenedores expuestos a T^a ambiente (20-25°C) fue de 91.9% y 91.5% con respecto al valor basal para las mezclas de 1 y 2 mg/mL respectivamente, sin embargo, algunas mezclas individuales tuvieron un porcentaje inferior al 10% de la concentración basal.

En conjunto, los resultados obtenidos en la validación de las prestaciones analíticas de la técnica para este tipo de muestras (recuperación después del tratamiento superior al 92%, imprecisión intradía del 1.4% e interdía del 2%), son valores muy aceptables, teniendo en cuenta el complejo proceso de obtención de la muestra para poder ser analizada. Los resultados del estudio de estabilidad facilitan la preparación y administración del fármaco en la práctica clínica. Así mismo, al no tener que ser preparada extemporáneamente se produce una reducción de costes sin disminuir la calidad.

Se han realizado estudios de estabilidad química de AnB en Intralipid, posteriores a la publicación de este trabajo. En uno de ellos, se ensaya a las concentraciones de 0.05 y 0.5 mg/mL, obteniendo como resultado que es estable al menos en las 24 horas en que se realiza el estudio, a temperatura ambiente (23-25°C), con y sin protección de la luz (99). También estudian cambios físico-químicos (evidencia de precipitación, cambios en la apariencia física y pH), observando que sólo se produce una separación de fases (lípidos y AnB) que se soluciona homogeneizando el frasco que contiene la emulsión; en cambio, no se observan precipitados y la disminución de pH es inferior a 0.5 unidades. Los resultados de estabilidad química coinciden con los nuestros, en lo que respecta a la concentración preparada de 0.5 mg/mL, al menos en las 24 horas en que duró el ensayo. En nuestro caso la estabilidad fue superior, ya que el estudio duró hasta 15 días, con mayor probabilidad de establecer tiempos de estabildades. Aunque en el apartado 4.2.1.2.1 de preparación de

las muestras se especifica que sólo se exponen los resultados del análisis químico, es interesante comentar que los obtenidos en nuestro estudio de compatibilidad físico-química, coinciden prácticamente con los del estudio mencionado anteriormente, observándose una coloración amarilla en el fondo del envase a las 4 horas de su preparación, que se resuelve al agitar uniformemente y no aparecen precipitados.

En otro estudio, evalúan la estabilidad química a las concentraciones de 0.1 y 1 mg/mL durante 21 días en Intralipid 10% o 20% encontrando que es estable durante todo este tiempo tanto a temperatura ambiente (23°C) como en frío (4°C), pero al mismo tiempo realizan un estudio de compatibilidad a las concentraciones de 0.6 mg/mL y 1.2 mg/mL para diferentes proporciones de Intralipid por cada 100 mL de mezcla, encontrando que es compatible si la proporción de lípido no excede del 30% (100). En nuestro estudio la compatibilidad físico-química se ha realizado a la concentración de 1 mg/mL, con una proporción de lípido de 80% en el volumen total de la muestra (20 mL de solución acuosa de AnB en 80 mL de Intralipid 20%), siendo estable los 15 días del estudio.

4.2.2.6 Aplicabilidad

Como aplicación directa a la estandarización del método por HPLC para cuantificar la AnB en muestras séricas y al estudio de estabilidad de AnB-IL, se realizó en nuestro hospital un estudio comparativo de eficacia, tolerancia y farmacocinético, de la fórmula convencional con respecto a la emulsión lipídica en pacientes neutropénicos y con resultados publicados en una revista de ámbito internacional con el título (145): *“Pharmacokinetics of conventional formulation versus fat emulsion formulation of amphotericin B in a group of patients with neutropenia”*. La eficacia clínica fue similar con ambas formulaciones, aunque la administración de AnB en Intralipid 20% tuvo mejor tolerancia con una menor alteración de la función renal. Los resultados farmacocinéticos sugieren que la AnB tiene un perfil de cinética diferente en

ambos preparados, presentando diferencias más acusadas en el volumen de distribución en estado de equilibrio, especialmente en el compartimento central. Se adjunta una reproducción de este artículo en el anexo de la memoria.

Tabla 4. Estabilidad de AnB en Intralipid® 20%

Concentración teórica (mg/mL)	Concentración basal (mg/mL) ^a	% Concentración recuperada						
		4 horas	12 horas	24 horas	2 días	4 días	7 días	15 días
20-25°C sin protección luz								
0.5	0.48±0.01	99.5±0.8	100.0±1.8	100.2±1.6	100.8±1.8	99.6±1.7	92.3±1.4	87.7±0.6
1	0.92±0.03	99.3±1.8	99.8±2.3	98.9±1.3	98.0±3.0	97.9±2.5	91.9±5.6	87.3±2.5
2	1.86±0.04	100.0±2.5	99.8±2.7	99.8±3.0	100.0±1.1	99.9±1.6	91.5±2.0	88.5±0.2
20-25°C con protección luz								
0.5	0.48±0.01	99.8±1.8	99.7±2.7	99.3±1.6	99.9±1.0	99.5±1.7	92.9±1.3	87.9±0.8
1	0.92±0.03	100.3±1.6	100.3±1.2	100.0±1.5	100.1±2.0	99.5±2.0	93.7±3.2	88.3±6.2
2	1.86±0.04	99.6±2.6	100.5±0.5	100.4±0.3	100.2±2.4	99.9±2.5	92.3±1.1	88.1±4.3
4-8°C con protección luz								
0.5	0.48±0.01	99.5±0.3	99.5±1.3	99.5±1.9	99.2±1.6	99.7±0.9	97.3±0.2	90.2±2.4
1	0.92±0.03	99.4±2.3	99.1±3.6	99.4±2.2	99.0±1.7	99.5±3.6	96.0±1.9	92.6±5.9
2	1.86±0.04	99.8±1.9	99.9±1.3	100.2±2.6	99.9±1.7	99.6±1.9	96.3±2.0	89.5±0.1

^a media±sd (n=3)

4.3 DETERMINACIÓN DE ANFOTERICINA B EN SECRECIONES RESPIRATORIAS

“Amphotericin B determination in respiratory secretions by reversed-phase liquid chromatography”

López R, Pou L, Andrés I, Monforte V, Román A, Pascual C.

Journal of Chromatography A 1998; 812: 135-9

4.3.1 Metodología experimental

4.3.1.1 Preparación de soluciones estándares y calibradores

- *Solución stock* dilución de 50 mg de AnB (Fungizona[®]) en 10 mL de agua estéril para inyección; concentración 5mg/mL. Se congela a -80°C.
- *Estándar acuoso intermedia* 100 μ L de la solución stock se diluyen hasta 10 mL con agua destilada; concentración 50 μ g/mL. Se prepara en el mismo día de procesar una serie analítica.
- *Estándares metanólicos* a partir del estándar intermedio 50 μ g/ml se preparan los siguientes estándares de trabajo con metanol 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 y 5 μ g/mL. Se utiliza metanol en vez de agua destilada para que muestras y estándares se procesen con la misma matriz (desproteinización y reconstitución del eluato obtenido de la extracción del fármaco de la matriz de las secreciones respiratorias con metanol). Estos estándares se preparan en el mismo día de procesar una serie analítica.
- *Estándares de broncoaspirado y lavado broncoalveolar*: a partir del estándar intermedio 50 μ g/mL, se adiciona AnB a un "pool" libre del fármaco de broncoaspirado y lavado broncoalveolar respectivamente para obtener las siguientes concentraciones 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 y 5 μ g/mL. Se congelan a -80°C hasta el momento de su análisis.

4.3.1.2 Pretratamiento de las muestras

4.3.1.2.1 Broncoaspirado

El volumen total de las muestras se mezcló con metanol a partes iguales (1:1, v/v), se homogeneizó en agitador mixer durante 1 min y posteriormente se centrifugó durante 20 min a 3000 rpm. Los estándares se procesaron de la misma forma. Antes del análisis, 200 μ L de sobrenadante metanólico se mezcló homogéneamente con 400 μ L de agua. Alícuotas de esta mezcla se inyectaron por duplicado en el cromatógrafo.

4.3.1.2.2 Lavado broncoalveolar

Se cuantificó el volumen de muestra y después se mezcló con metanol a partes iguales (1:1, v/v), se homogeneizó en agitador mixer durante 1 min y se centrifugó 20 min a 3000 rpm. El sobrenadante se combinó con el mismo volumen de tampón acetato sódico 0.01 M (pH 7.4) (v/v). La mezcla se aplicó en cartuchos Sep-Pak C₁₈ que previamente habán sido acondicionados con 3 mL de acetonitrilo dos veces seguido de 3 mL de tampón acetato sódico también dos veces. Después de pasar la muestra, se lavó la columna con 3 mL de metanol/tampón acetato sódico (1:1, v/v) cinco veces. La AnB se eluyó con 3 mL de metanol en dos veces. El eluato final se evaporó a sequedad en atmósfera de nitrógeno. El extracto seco se reconstituyó con 400 µL de metanol y se agitó durante 15 s. Los estándares se procesaron de la misma forma. Antes del análisis, 200 µL de sobrenadante metanólico se mezcló homogéneamente con 400 µL de agua. Alícuotas de esta mezcla se inyectaron por duplicado en el cromatógrafo.

4.3.1.3 Condiciones cromatográficas

- Fase móvil: Acetonitrilo/EDTANa2 2.5 mM (30/70 v/v).
- Columna: 30 mm x 4.6 mm I.D. Perkin-Elmer C₁₈ 3 µm tamaño partícula.
- Volumen de muestra: 80 µL.
- Inyección de las muestras y estándares por duplicado.
- Condiciones de detección:
 - Longitud de onda: 405 nm
 - Sensibilidad del detector: 0.02 AUFS.
- Tiempo de cromatograma: 3 minutos
- Acondicionamiento de la columna previo al análisis:
 - Fase móvil: 30 minutos a flujo 1 mL/min.
- Regeneración de la columna después de una serie analítica:
 - Agua: 20 minutos a flujo 1 mL/min.
 - Acetonitrilo: 20 minutos a flujo 1 mL/min.
 - Acetonitrilo/agua (70/30 v/v): 20 minutos a flujo 1 mL/min.

4.3.1.4 Recuperación

La recuperación se calculó comparando el área del pico de la AnB de los estándares de broncoaspirado y lavado broncoalveolar (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 y 5 µg/mL) con el de soluciones metánicas de concentración equivalente respectivamente. Las muestras de ambos tipos de secreciones respiratorias fueron procesadas cinco veces (n=5) en series analíticas distintas.

4.3.1.5 Imprecisión intraserial

Se determinó analizando 10 veces dentro de la misma serie analítica, dos muestras, una de concentración de AnB de 0.5 µg/mL y otra de 2.5 µg/mL, preparadas a partir de un "pool" de broncoaspirado y lavado broncoalveolar respectivamente a los cuales les fue adicionado el fármaco.

4.3.1.6 Imprecisión interserial

Se evaluó determinando una vez al día durante 10 días dos muestras procedentes del "pool" anteriormente citado para broncoaspirado y 5 días para lavado broncoalveolar. Se conservaron a -80°C.

4.3.1.7 Estabilidad

Se calculó en función del porcentaje de concentración de AnB encontrada con respecto a la concentración inicial a tiempo cero. Se considera no estable a partir del 10% de descenso en la concentración encontrada con respecto a la inicial (144).

Se preparó AnB en secreciones respiratorias adicionando 0.5 y 2.5 µg/mL del fármaco a dos muestras procedentes de un "pool" de broncoaspirado y lavado broncoalveolar respectivamente. El estudio de estabilidad se efectuó bajo tres condiciones de conservación: T^a ambiente (20-25°C), refrigeración (4-8°C) y congelación a -20°C, y a los siguientes tiempos: 1, 2, 7, 15, 30, 60 y 90 días. Las muestras se mantuvieron congeladas a -80°C hasta el momento de su análisis.

4.3.1.8 Curva de calibración y cálculo de resultados

La curva de calibración se calculó por regresión lineal a partir de las áreas de los picos correspondientes a los estándares, procesados en cada serie analítica. La concentración de las muestras se obtuvo por interpolación de su área en la recta de calibración. La concentración final de muestras de broncoaspirado se calcularon multiplicando la concentración obtenida por el factor de dilución 2. Las muestras de lavado broncoalveolar se calculan dividiendo la concentración obtenida por el factor de concentración (volumen total medido en $\mu\text{L}/400$).

4.3.2 Resultados y discusión

En este trabajo se presenta una adaptación para cuantificar AnB en muestras respiratorias (broncoaspirado o BAS y lavado broncoalveolar o BAL) a partir del método de determinación de AnB para muestras séricas por HPLC, ya explicado en el apartado 4.2.1.

La AnB administrada de forma inhalada se ha mostrado como un tratamiento eficaz y seguro en la profilaxis de la aspergilosis pulmonar invasiva. Tras la experiencia en nuestro centro en pacientes portadores de trasplante de pulmón, se planteó la realización de un estudio farmacocinético como evidencia científica a la eficacia clínica demostrada, tal como se describe en el apartado 1.11 de la introducción.

Dada la inexistencia de métodos estandarizados para la determinación de AnB en muestras respiratorias, fue necesario desarrollar una técnica específica para la cuantificación de AnB en BAS y BAL.

4.3.2.1 Adaptación de las condiciones cromatográficas

Basándonos en la técnica estandarizada en suero humano, las condiciones cromatográficas fijadas fueron las mismas que las descritas para muestras séricas, ya que las concentraciones de los estándares metanólicos utilizados comprenden el mismo intervalo de concentraciones que los estándares séricos.

4.3.2.2 Pretratamiento de las muestras

En la bibliografía no se encontraron referencias sobre pretratamiento de muestras respiratorias para cuantificar AnB por métodos cromatográficos, de manera que basándonos en el tratamiento utilizado en muestras séricas, precipitación de proteínas con metanol e inyección del sobrenadante, se adaptó este procedimiento para extraer la AnB de los productos (BAS y BAL). Teniendo en cuenta, la sistemática de obtención de estas secreciones respiratorias, el proceso de pretratamiento se consideró en una primera fase igual para los dos tipos de muestra y después se diferenció para la extracción del fármaco del BAL:

1º) BAS. Es un producto obtenido directamente de las vías respiratorias por acción mecánica de aspiración, sin adición de ningún tipo de líquido, de manera que la determinación de AnB en este tipo de muestras es el resultado directo del análisis cromatográfico teniendo en cuenta la dilución realizada para precipitar las proteínas y otras células circulantes en el broncoaspirado. El sobrenadante obtenido de la precipitación y centrifugación es inyectado en el cromatógrafo, tal como se especifica en el apartado 4.3.1.2.1.

2º) BAL. Es un producto obtenido de las vías respiratorias altas y bajas por aspiración, previo lavado con suero fisiológico, de manera que el fármaco se encuentra diluido en la muestra y debe ser concentrado para cuantificarse. La primera fase, común con el BAS, incluye precipitación de proteínas y otras células que pueden interferir en el análisis, seguido de otra fase de concentración del fármaco por columnas en fase sólida, tal como se especifica en el apartado 4.3.1.2.2. Para el cálculo se tuvo en cuenta las diluciones y procesos de concentración efectuados.

4.3.2.3 Validación de las prestaciones analíticas

4.3.2.3.1 Recuperación

Los resultados de la recuperación del método se exponen en la siguiente tabla:

Concentración añadida (μ g/mL)	Recuperación (%)	
	BAS (n=5)	BAL (n=5)
	X \pm SD	X \pm SD
0.1	93.9 \pm 8.3	90.0 \pm 21.6
0.25	89.7 \pm 2.7	89.7 \pm 6.3
0.5	93.1 \pm 4.1	87.2 \pm 10.7
1.0	91.5 \pm 7.1	90.2 \pm 14.8
2.5	95.4 \pm 4.7	86.8 \pm 6.6
5.0	94.9 \pm 1.6	97.1 \pm 3.8

La recuperación global (n=30) del BAS y del BAL fue de 93.1 \pm 2.2 y 90.2 \pm 3.7% respectivamente.

La eficiencia de la extracción fue superior al 86% para todas las concentraciones estudiadas, siendo la media de la recuperación superior al 90% tanto para BAS como BAL. Teniendo en cuenta el complejo pretratamiento de las muestras de BAL, nuestros resultados justifican que no se utilice estándar interno en la técnica. Ello implica una mayor simplificación en el método analítico.

4.3.2.3.2 Imprecisión intraserial

Los resultados de la imprecisión intraserial del método se exponen en la siguiente tabla:

--

Muestran	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)				
	Teórica	Encontrada	Intervalo (media \pm SD)	CV(%)	
BAS	10	0.5	0.52 \pm 0.029	0.47-0.55	5.58
		2.5	2.42 \pm 0.133	2.12-2.60	5.50
BAL	10	0.5	0.39 \pm 0.012	0.37-0.41	3.10
		2.5	2.32 \pm 0.110	2.10-2.48	4.74

La imprecisión intraserial fue inferior al 6% para las muestras de BAS y BAL a los dos niveles de concentración estudiados, siendo muy aceptables ya que en técnicas cromatográficas un método se considera preciso por debajo del 10% de coeficiente de variación (CV) (145).

4.3.2.3.2 Imprecisión interserial

Los resultados de la imprecisión interserial del método se exponen en la siguiente tabla:

Muestran	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)				
	Teórica	Encontrada	Intervalo (media \pm SD)	CV(%)	
BAS	10	0.5	0.51 \pm 0.021	0.48-0.54	4.12
		2.5	2.47 \pm 0.088	2.36-2.60	3.56
BAL	5	0.5	0.48 \pm 0.057	0.40-0.55	11.87
		2.5	2.42 \pm 0.175	2.20-2.56	7.23

La imprecisión intradía para las muestras de BAS fue inferior al 5%. En cambio para las muestras de BAL el coeficiente de variación fue superior al 10% en el nivel de concentración bajo estudiado (0.5 µg/mL). Esta baja reproductibilidad de las muestras BAL comparadas con las de BAS puede ser debido a la mayor manipulación en el proceso de pretratamiento. Las de BAS sólo se someten a una dilución con metanol, mientras que las de BAL presentan adicionalmente una extracción sólido-líquido.

4.3.2.4 Estabilidad

En la tabla 5 se muestran los resultados de los cambios de concentraciones de las muestras de AnB en BAS y BAL, expresados en porcentajes (%) respecto al valor basal (tiempo 0) a las diferentes condiciones de temperatura y concentración preparadas.

La AnB en las muestras de BAS se mantuvo estable, entre el 90% y 110% de la concentración inicial, durante dos días a temperatura ambiente (20-25°C), 15 días a 4°C y los tres meses del estudio a -20°C. En las muestras de BAL, la AnB se mantuvo estable un día a temperatura ambiente (20-25°C), 7 días a 4°C y 1 mes a -20°C. La menor estabilidad de la AnB en BAL comparado con el BAS, puede ser debido a que el primero se obtiene con lavados de suero salino fisiológico, solución que puede afectar a la estabilidad de la AnB, mientras que el BAS se obtiene como producto respiratorio de aspiración directa.

La finalidad del estudio de estabilidad química de este tipo de muestras, es para establecer cuanto tiempo pueden conservarse y en que condiciones hasta que sean procesadas.

En conclusión, los resultados obtenidos en la adaptación y validación del método cromatográfico para determinar AnB en muestras respiratorias (BAS y BAL), presentan una buena recuperación, precisión y sensibilidad, de forma que puede ser usado para la monitorización y estudios farmacocinéticos de AnB inhalada.

4.3.2.5 Aplicabilidad

Para poder realizar el estudio farmacocinético de AnB en muestras respiratorias, se planteó hacer previamente un estudio de estabilidad química de la solución acuosa de AnB a la concentración de 1 mg/mL (preparación habitual como fórmula magistral para la profilaxis y tratamiento de la aspergillosis pulmonar invasiva), debido al incremento de pacientes trasplantados pulmonares en nuestro hospital que la utilizaban, con la finalidad de optimizar recursos y facilitar una mejora en la calidad de vida, sin disminuir la calidad de atención. Los resultados de este estudio, realizado en 1995, fueron publicados en una revista de ámbito internacional con el título (146): “*Stability of amphotericin B in water solution for inhalation*”. A partir de entonces la formulación magistral de AnB en solución acuosa a la concentración de 1 mg/mL, se prepara con una caducidad de un mes, a diferencia de la caducidad máxima establecida de una semana tal como se referenciaba en la literatura (109,110). Se adjunta una reproducción en el anexo de la memoria.

La aplicación del método desarrollado ha permitido el estudio farmacocinético de la AnB nebulizada en secreciones respiratorias con resultados publicados en diversas comunicaciones en forma de poster y comunicación oral (se adjuntan las reproducciones de las comunicaciones en formato abstract en el anexo de la memoria):

1. “*Farmacocinética de la anfotericina B nebulizada en secreciones respiratorias en el trasplante pulmonar*”. XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. Madrid, mayo de 1999. Poster. (147).
2. “*Pharmacokinetics of nebulized amphotericin-B in respiratory samples of lung transplantated patients*”. E.R.S. annual congress. Madrid, October 1999. Poster. (148).

3. “*Pharmacokinetics and distribution of nebulized amphotericin B (n-Amp) in lung transplantation*”. International Society for Heart and Lung Transplantation. 20th Annual Meeting and Scientific Sessions. Osaka, Japan, April 2000. Comunicación oral. (149)

4. “*Farmacocinética y distribución de la anfotericina B nebulizada en el trasplante de pulmón*”. IX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Santiago de Compostela, mayo de 2000. Poster. Premio a la mejor comunicación presentada en forma de poster. (150).

Condiciones de temperatura (°C)		Concentración (µg/mL)	% Concentración recuperada									
			basal	1 día	2 días	7 días	15 días	1 mes	2 meses	3 meses		
BAS												
20-25	4	0.5	0.53	98.8	95.1	85.9	87.1	85.3	82.1	68.5		
		0.5	0.53	97.7	97.6	99.2	99.8	84.5	84.7	75.6		
		0.5	0.53	100.6	98.2	101.1	95.2	95.3	92.5	92.3		
20-25	4	2.5	2.20	98.5	93.1	82.7	84.4	84.1	79.8	62.3		
		2.5	2.20	105.8	94.5	106.6	102.8	89.6	86.9	78.3		
		2.5	2.20	107.0	103.8	104.7	104.6	104.8	103.1	95.1		
BAL												
20-25	4	0.5	0.49	96.9	69.1	53.7	43.6	30.5	30.7	25.6		
		0.5	0.49	92.6	100.0	91.7	76.4	65.2	54.6	48.7		
		0.5	0.49	92.6	91.3	95.3	91.8	94.7	82.8	76.3		
20-25	4	2.5	2.49	94.4	87.9	77.4	69.4	63.9	43.9	39.2		
		2.5	2.49	98.4	93.3	94.5	61.4	30.8	36.1	32.3		
		2.5	2.49	92.4	96.4	94.7	101.1	98.4	81.2	75.7		

5.CONCLUSIONES

- 1) La determinación de AnB por cromatografía líquida en columnas de 30 mm de longitud, es un método más rápido que los anteriormente descritos con columnas convencionales (125 a 300 mm). Las nuevas técnicas publicadas en la literatura, posteriores a este trabajo, no aportan ninguna ventaja en cuanto a la rapidez, ya que utilizan columnas de 100 a 300 mm.
- 2) La recuperación, sensibilidad, linealidad y reproductibilidad del método analítico son adecuados para la realización de estudios farmacocinéticos en suero y de estabilidad química del fármaco en emulsiones lipídicas y soluciones acuosas.
- 3) La recuperación y reproductibilidad del método de extracción de AnB en muestras lipídicas son idóneas para estudios de estabilidad del fármaco en este tipo de soluciones.
- 4) La estabilidad química de AnB en Intralipid 20% a T^a ambiente (20-25°C), con y sin protección lumínica y refrigerada (4-8°C) fue la siguiente:
 - 4.1 AnB (0.5 mg/mL). Estable 1 semana en las 3 condiciones de estudio.
 - 4.2 AnB (1 y 2 mg/mL). Estables 4 días a T^a ambiente sin proteger de la luz, una semana protegidas de la luz y refrigeradas.
- 5) La recuperación y reproductibilidad del método de determinación de AnB en broncoaspirados y lavados broncoalveolares son adecuados para la cuantificación de AnB en secreciones respiratorias.
- 6) La AnB en muestras de broncoaspirado fue estable dos días a T^a ambiente (20-25°C), 15 días refrigeradas (4-8°C) y 3 meses congeladas (-20°C).
- 7) La AnB en muestras de lavado broncoalveolar fue estable 24 horas a T^a ambiente (20-25°C), 7 días refrigeradas (4-8°C) y 1 mes congeladas (-20°C).

8) En base a los resultados obtenidos en los trabajos presentados en esta memoria, las técnicas de determinación de AnB por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), estandarizadas y validadas, son adecuadas para la realización de estudios farmacocinéticos y de estabilidad química de AnB.

6. AGRADECIMIENTOS

He de dar las gracias sinceramente a aquellas personas que han colaborado en la realización de este trabajo. La ayuda de todas ellas ha sido imprescindible:

A las enfermeras de la Unidad 8 del Servicio de Bioquímica, M^a Angeles Vega, Dolors Palau y Sofía García, por su colaboración y por los buenos momentos vividos.

A la Dra. Rosa M^a Segura, por saber transmitirme en mi formación como residente, su "espíritu" metodológico y científico.

A todo el personal del Servicio de Bioquímica del Hospital General Vall d'Hebron, porque habiendo contribuido en mi formación como farmacéutica interna residente, también han contribuido de alguna manera a la realización de este trabajo.

Al Dr. Bruno Montoro, por sus ideas, que han podido ser realizadas y han dado sus frutos en parte de este trabajo.

A Victor Monforte y al Dr. Antonio Roman, por su perseverancia y esfuerzo para que el estudio de anfotericina B inhalada en la profilaxis del paciente portador de trasplante de pulmón se llevase a cabo.

A la Dra. Margarita Sentís por el interés que mostrado en el trabajo.

A los Dres. Carlos Pascual y Josep Monterde por su dirección acertada, las horas de dedicación a este trabajo, y sobretodo, por su generosa disposición.

Muy especialmente, a Leonor Pou por su útil y desinteresada colaboración, y por supuesto a la gran profesionalidad que ha demostrado en todo momento con su ayuda y animosidad para que este trabajo saliera adelante.

A mis padres, Luciano y Antonia, que me han apoyado y que con su comprensión, han estado siempre de acuerdo en la elección de mi futuro profesional.

A mi marido Juan Carlos, mi más fiel animador para que este trabajo saliera a la luz.

A todos ellos, gracias.

Este trabajo ha sido realizado en parte gracias a la concesión de una beca de ampliación de estudios del *Fondo de Investigación Sanitaria* (referencia: 96/5124)

7. BIBLIOGRAFIA

- 1- Schurmann D, de Matos Marques B, Grunewald T, Phole HD, Hahn H, Ruf B. Safety and efficacy of liposomal amphotericin B in treating AIDS-associated disseminated cryptococcosis. *J Infect Dis* 1991;164:620-2.
- 2- Coker R, Horner PJ. Short-course treatment and response to liposomal amphotericin B in AIDS-associated cryptococcosis. *J Infect Dis* 1992;165:593.
- 3- Powderly WG. Cryptococcal meningitis and AIDS. *Clin Infect Dis* 1993;17:837-42.
- 4- Minamoto G, Armstrong D. Fungal infections in AIDS: Histoplasmosis and coccidioidomycosis. *Infect Dis Clin North Am* 1988;2:447-56.
- 5- McKinsey DS, Gupta MR, Dricks MR, Smith DL, O'Connor M. Histoplasmosis in patients with AIDS: efficacy of maintenance amphotericin B therapy. *Am J Med* 1992;92:225-7.
- 6- Wheat LJ, Connolly-Stringfield PA, Baker RL, Curfman MF, Eads ME, Israel KS et al. Disseminated histoplasmosis in the acquired immune deficiency syndrome: clinical findings, diagnosis and treatment, and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1990;69:361-74.
- 7- Drew RH. Pharmacotherapy of disseminated histoplasmosis in patients with AIDS. *Ann Pharmacother* 1993;27:1510-8.
- 8- Galgiani JN, Ampel NM. Coccidioidomycosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1990;162:1165-9.
- 9- Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis* 1990;12:308-29.
- 10- Lyman CA, Walsh TJ. Systemically administered antifungal agents. *Drugs*

-
- 1992;44:9-35.
- 11- Sabra R, Branch RA. Amphotericin B nephrotoxicity. *Drug Safety* 1990;5:94-108.
- 12- Drugs used for Systemic Mycoses. *Drugs Evaluations Annual* 1994. 10^a ed. USA: AMA, Division of Drugs and Toxicology; 1994. p.1661-83.
- 13- Khoo SH, Bond J, Denning DW. Administering amphotericin B-a practical approach. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:203-13.
- 14- Drugs Information for the Health Care Professional, Vol I, USP, DI 1994. 14^a ed. Rockville: USPC; 1994. p.86-90.
- 15- Bennett JE. Antimicrotics agents. 3^a ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. En: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, (eds). New York: Churchill Livingstone; 1990. p.361-70.
- 16- Martindale. *The Extra Pharmacopeia*. 30^a ed. London: Reynolds J; 1993. p.315-32.
- 17- Robinson RF, Nahata MC. A comparative review of conventional and lipid formulations of amphotericin B. *J Clin Pharm Ther* 1999;24:249-57.
- 18- Slain D. Lipid-Based Amphotericin B for the treatment of fungal infections. *Pharmacotherapy* 1999;19:306-23.
- 19- Boswell GW, Buell D, Bekersky I. Ambisome (Liposomal Amphotericin B): A Comparative Review. *J Clin Pharmacol* 1998;38:583-92.
- 20- Monografía de producto del Abelcet (anfotericina B en complejo lipídico). Liposome Company. Princenton, Nj, U.S.A, 1996.

-
- 21- Amantea MA, Bodwen RA, Forrest A, Working PK, Newman MS, Mamelok RD.
Population pharmacokinetics and renal function-sparing effects of amphotericin B colloidal dispersion in patients receiving bone marrow transplants. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2042-7.
- 22- Heinemann V, Bosse D, Jehn U, Kahny B, Wachholz K, Debus A et al.
Pharmacokinetics of liposomal amphotericin B (AmBisome) in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1275-80.
- 23- Chavanet PY, Garry I, Charlier N, Caillot D, Kisterman JP, D'Athis M et al.
Trial of glucose versus fat emulsion in preparation of amphotericin for use in HIV infected patients with candidiasis. *Br Med J* 1992;305:921-3.
- 24- Moreau PH, Milpied N, Fayett N, Ramée JF, Harousseau JL. Reduced renal toxicity and improved clinical tolerance of amphotericin B mixed with Intralipid compared with conventional amphotericin B in neutropenic patients. *J Antimicrob Chemother* 1992;30:535-41.
- 25- Caillot D, Chavanet P, Casasnovas O, Solary E, Zanetta G, Buisson M et al.
Clinical evaluation of a new lipid-based delivery system for intravenous administration of amphotericin B. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:722-5.
- 26- Chavanet PY, Charlier N, Brenet A, Goux A, Muggéo D, Caillot D et al.
Émulsion de l'amphotéricine B dans l'Intralipide 20%:efficacité in vitro et in vivo. *Pathol Biol* 1992;40:507-12.
- 27- Caillot D, Casasnovas O, Solary E, Chavanet P, Bonotte B, Reny G et al.
Efficacy and tolerance of an amphotericin B lipid (Intralipid) emulsion in the treatment of candidaemia in neutropenic patients. *J Antimicrob Chemother* 1993;31:161-9.

-
- 28- Kan VL, Bennett JE, Amantea MA, Smolskis MC, McManus E, Grasela DM et al. Comparative safety, tolerance and pharmacokinetics of amphotericin B lipid complex and amphotericin B desoxycholate in healthy male volunteers, *J Infect Dis* 1993;164:418-21.
- 29- Leake HA, Appleyard MN, Hartley JPR. Successful treatment of resistant cryptococcal meningitis with amphotericin B lipid emulsion after nephrotoxicity with conventional intravenous amphotericin B. *J Infect* 1994;28:319-22.
- 30- Thakur CP. Comparison of glucose versus fat emulsion in the preparation of amphotericin B for use in kala-azar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88:698-9.
- 31- Caillot D, Reny G, Solary E, Casasnovas O, Chavanet P, Bonnotte B et al. A controlled trial of the tolerance of amphotericin B infused in dextrose or in Intralipid in patients with haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33:603-13.
- 32- Altés J, Riera M, García M, Payeras A, Puigventós F. Anfotericina B en emulsión lipídica para el tratamiento de leishmaniosis visceral y aspergilosis invasiva. III Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 1994. (Abstract).
- 33- Gómez P, Martín R, Bejarano D, Rodríguez J, Miguel M. Seguimiento de pacientes en tratamiento con anfotericina B en emulsión lipídica. XIL Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH). Toledo, octubre 1994. (Abstract).
- 34- Vita E. Intralipid in prophylaxis of amphotericin B nephrotoxicity. *Ann Pharmacother* 1994;28:1182-3.
- 35- Anderson RP, Clark DA. Amphotericin B toxicity reduced by administration in fat emulsion. *Ann Pharmacother* 1995;29:496-500.

-
- 36- Pascual B, Ayestarán A, Montoro JB, Oliveras J, Estibalez A, Julià A et al. Administration of lipid-emulsion versus conventional amphotericin B in patients with neutropenia. *Ann Pharmacother* 1995;29:1197-201.
- 37- Eisenberg RS, Oatway WH. Nebulization of amphotericin B. *Am Rev Resp Dis* 1971;103:289-92.
- 38- Oehling A, Girón M, Subirá ML. Aerosol chemotherapy in broncopulmonary candidiasis. *Respiration* 1975;32:179-84.
- 39- Rodenhuis S, Beaumont F, Kauffman HF, Sluiter HJ. Invasive Pulmonary aspergillosis in a non-immunosuppressed patient: successful management with systemic amphotericin B and flucytosine and inhaled amphotericin B. *Thorax* 1984;39:78-9.
- 40- Schmitt HJ, Bernard EM, Häuser M, Amstrong D. Aerosol amphotericin B is effective for prophylaxis and therapy in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1676-9.
- 41- Niki Y, Bernard EM, Schmitt HJ, Tong WP, Edwards FF, Amstrong D. Pharmacokinetics of aerosol amphotericin B in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:29-32.
- 42- Schmitt HJ. New methods of delivery of Amphotericin B. *Clin Infect Dis* 1993; 17(Suppl 2):s501-6.
- 43- Allen SD, Sorensen KN, Nedjl MJ, Durrant C, Proffit RT. Prophylactic efficacy of aerosolized liposomal (Ambisome) and non-liposomal (Fungizone) amphotericin B in murine pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34:1001-13.

-
- 44- Conneally E, Cafferkey MT, Daly PA, Keane CT, McCann SR. Nebulized amphotericin B as prophylaxis against invasive aspergillosis in granulocytopenic patients. *Bone Marrow Transplant* 1990;5:403-6.
- 45- Myers SE, Devine SM, Tooper RL, Onfrey M, Chandler C, O'Tolle K et al. A pilot study of prophylactic aerosolized amphotericin B in patients at risk for prolonged neutropenia. *Leukemia and Lymphoma* 1992;8:229-33.
- 46- Ferriols F, Cervantes A, Rodilla F, Escrivá S, Aznar J, Ezquer J et al. Preparación y utilización de la anfotericina B endovenosa y aerosol en pacientes neutropénicos. xviii Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH). Palma de Mallorca, septiembre 1993. (Abstract).
- 47- Gryn J, Golderg J, Johson E, Siegel J, Inzerillo J. The toxicity of daily inhaled amphotericin B. *Am J Clin Oncol* 1993;16:43-6.
- 48- Beyer J, Barzen G, Risse G, Weyer C, Miksits K, Dullenkopf K et al. Aerosol amphotericin B for prevention of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1367-9.
- 49- Beyer J, Schwartz S, Barzen G, Risse G, Dullenkopf K, Weyer C et al. Use of amphotericin B aerosols for the prevention of pulmonary aspergillosis. *Infection* 1994;22:143-8.
- 50- Cafferkey MT. Chemoprophylaxis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:917-24.
- 51- Behre GF, Schwarz S, Lenz K, Ludwig WD, Wandt H, Schilling E et al. Aerosol amphotericin B inhalations for prevention of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic cancer patients. *Ann Hematol* 1995;71:287-91.

-
- 52- Dubois J, Bartter T, Gryn J, Pratter MR. The physiologic effects of inhaled amphotericin B. *Chest* 1995; 108:750-53.
- 53- Tsourounis C, Guglielmo J. Aerosolized amphotericin B in profilaxys of pulmonary aspergillosis. *Ann Pharmacother* 1996;30:1175-6.
- 54- Dal Conte I, Riva G, Obert R, Luchini A, Bechis G, De Rosa G et al. Tracheobronchial aspergillosis in a patient with AIDS treated with aerosilized amphotericin B combined with itraconazole. *Mycoses* 1996;39:371-4.
- 55- Ausina V. Introducción a la micología médica. Terapia antifúngica. Enfermedades Infecciosas. En: Verger G, (ed). Barcelona: Ediciones Doyma; 1989. p.351-8.
- 56- Cipolle RJ, Solomkin JS. Amphotericin B. A Textbook for the Clinical Application of Therapeutic Drug Monitoring. En: Taylor WJ, Caviness MH (eds). Irving: Abbott Laboratories, Diagnostics Division; 1986. p.321-8.
- 57- Antifungal Antibiotics. American Hospital Formulary Service (AHFS) Drug Information 1995. 37^a ed. En: McEvory (ed.). Bethesda: American Society of Health-System Pharmacy (ASHP); 1995. p72-6.
- 58- Wilson E, Tharson L, Speert DP. Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:796-800.
- 59- Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS, Medoff G. Amphotericin B. Current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:183-8.
- 60- Kintzel PE, Smith GH. Practical guidelines for the preparing and administering amphotericin B. *Am j Hosp Pharm* 1992;49:1156-64.

-
- 61- Dugoni B, Guglielmo BJ, Hollander H. Amphotericin B concentrations in cerebral fluid of patients with AIDS and cryptococcal meningitis. *Clin Pharm* 1989;8:220-1.
- 62- Hoeprich PD. Elimination half-life of amphotericin B. *J Infect* 1990;20:173-5.
- 63- Walsh TJ, Pizzo PA. Treatment of systemic fungal infections: Recent progress and current problems. *Eur J Clin Microb Infect Dis* 1988;7:460-75.
- 64- Salaski JS, Louria DB, Chmel H. Fungal and yeast infections of the central nervous system: a clinical review. *Medicine (Baltimore)* 1984;63:108-32.
- 65- Dismukes WE et al. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. Treatment of cryptococcal meningitis with combination amphotericin B and flucytosine for four as compared with six weeks. *N Engl J Med* 1987;317:334-41.
- 66- Polsky B, Depman MR, Gold JWM, Galicich JH, Armstrong D. Intraventricular therapy of cryptococcal meningitis via a subcutaneous reservoir. *Am J Med* 1986;81:24-8.
- 67- Reichenspurner H, Gamberg P, Nitschke M, Valantine H, Hunt S, Oyer PE et al. Significant reduction in the number of fungal infections after lung-, heart-lung, and heart transplantation using aerosolized amphotericin B prophylaxis. *Transplant Proc* 1997;29:627-8.
- 68- Birsan T, Taghavi S, Klepetko W. Treatment of aspergillus-related ulcerative tracheobronchitis in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17:437-8.
- 69- Calvo V, Borro JM, Morales P, Morcillo A, Vicente R, Tarrazona V et al.

-
- Antifungal prophylaxis during the early postoperative period of lung transplantation. Valencia Lung Transplant Group. *Chest* 1999;115:1301-4.
- 70- Hartman BJ. Fungal peritonitis. *Infect Surg* 1986;January:27-36.
- 71- Eisenberg ES, Leviton I, Soeiro R. Fungal peritonitis in patients receiving peritoneal dialysis: experience with 11 patients and review of the literature. *Rev Infect Dis* 1986;8:309-21.
- 72- Karp Je, Merz WG, Bamberger BJ, Charache P. Response to amphotericin B during intensive antileukemic therapy: correlation with fungal infection and coonitazion (abstract). 27th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology. Washington, 1987. (Abstract).
- 73- Serody JS, Mill MR, Detterbeck FC, Harris DT, Cohen MS. Blastomycosis in transplant recipients: report of case and review. *Clin Infect Dis* 1993;16:54-8.
- 74- Fainstein V, Bodey GP, Elting L, Maksymiuk A, Keatin M, McCredie KB. Amphotericin B or ketoconazole therapy of fungal infections in neutropenic cancer patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;37:11-5.
- 75- Meunier F. Prevention of mycoses in immunocompromised patients. *Rev Infect dis* 1987;9:408-16.
- 76- Meunier-Carpentier F, Snoeck R, Gerain J, Muller C, Klastersky J. Amphotericin B nasal sparay as prophylaxis against aspergillosis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 1984;311:1056. (Carta).
- 77- De Wit S, Weerts D, Goossens H, Clumeck N. Comparison of fluconazole and ketoconazole for oropharyngeal candidiasis in AIDS. *Lancet* 1989;1:746-8.

-
- 78- Hay KD. Candidosis of the oral cavity: recognition and management. *Drugs* 1988;36:633-42.
- 79- Benson JM, Nahata MC. Clinical use of systemic antifungal agents. *Clin Pharm* 1988;7:424-38.
- 80- Smego RA Jr, Perfect JR, Durack DT. Combined therapy with amphotericin B and 5-fluorocytosine for candida meningitis. *Rev Infect Dis* 1984;6:791-801.
- 81- Brod RD, Flynn HW Jr, Clarkson JG, Pflugfelder SC, Culbertson WW, Miller D. Endogenous candida endophthalmitis: management without intravenous amphotericin B. *Ophthalmology* 1990;97:666-74.
- 82- Grant IH, Armstrong D. Fungal infections in AIDS: Cryptococcus. *Infect Dis Clin North Am* 1988;2:457-64.
- 83- Lin AC, Goldwasser E, bernard Em, Chapman SW. Amphotericin B blunts erythropoietin response to anemia. *J Infect Dis* 1990;161:348-51.
- 84- Cleary JD, Chapman SW, Nolan RL. Pharmacologic modulation of interleukin-1 expression by amphotericin b-Stimulated human mononuclear cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:977-81.
- 85- Gigliotti F, Shenep JL, Lott L, Thornton D. Induction of prostaglandin synthesis as the mechanism responsible for the chills and fever produced by infusing amphotericin B. *J Infect Dis* 1987;156:784-9.
- 86- Heinemann V, Kähny B, Debus A, Wachholz W, Jehn U. Pharmacokinetics of liposomal amphotericin B (Ambisome) vs other lipid based formulations. *Bone Marrow Transplant* 1994;14(S5):S8-S9.
- 87- Raymond GG, Davis RL. Physical compatibility and chemical stability of

-
- amphotericin B combination with magnesium sulfate in 5% dextrose injection. DICP 1991;25:123-6
- 88- Wiest DB, Maish WA, Garner SS, el-Chaar GM. Stability of amphotericin B in four concentrations of dextrose injection. Am J Hosp Pharm 1991;48:2430-3.
- 89- Mitrano FP, Outman WR, Baptista RJ, Palombo JD. Chemical and visual stability of amphotericin B in 5% dextrose injection stored at 4°C for 35 days. Am J Hosp Pharm 1991;48:2635-7.
- 90- Kintzel PE, Kennedy PE. Stability of amphotericin B in 5% dextrose injection at concentrations used for administration through a central venous line. Am J Hosp Pharm 1991;48:283-5.
- 91- Lee MD, Hess MM, Boucher BA, Apple AM. Stability of amphotericin B in 5% dextrose injection stored at 4 or 25°C for 120 hours. Am J Hosp Pharm 1994;51:394-6.
- 92- Trissel LA. Amphotericin B does not mix with fat emulsion. Am J Health-Syst Pharm 1995;52:1463-4. (Carta).
- 93- Kintzel PE. Amphotericin B in fat emulsion. Am J Health-Syst Pharm 1996, 53:2701. (Editorial).
- 94- Ericcson O, Hallmen AC, Wikstrom I. Amphotericin B is incompatible with lipid emulsions. Ann Pharmacother 1996;30:298. (Carta).
- 95- Cleary JD. Amphotericin B formulated in a lipid emulsion. Ann Pharmacother 1996;30:409-12. (Editorial).
- 96- Ranchere JY, Latour JF, Fuhrmann C, Lagallarde C, Loreuil F. Amphotericin B intralipid formulation: stability and particle size. J Antimicrob Chemother

-
- 1996; 37:1165-9.
- 97- Sievers Tm, Kubak BM, Wong- Beringer A. Safety and efficacy of Intralipid emulsions of amphotericin B. *J Antimicrob Chemother* 1996;38:333-47.
- 98- Heide PE. Precipitation of amphotericin B from i.v. fat emulsion. *Am J Health-Syst Pharm* 1997;54:1449. (Carta).
- 99- Owens D, Fleming RA, Restino MS, Cruz JM, Hurd D. Stability of amphotericin B 0.05 and 0.5 mg/mL in 20% fat emulsion. *Am J Health-Syst Pharm* 1997;54:683-6.
- 100- Walker S, Tailor SA, Lee M, Louie L, Louie M, Simor AE. Amphotericin B in Lipid Emulsion: Stability, Compatibility, and In Vitro Antifungal Activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:762-6.
- 101- Heinemann V, Kahny B, Jehn U, Muhlhaber D, Debus A, Wachholz K et al. Serum pharmacology of amphotericin B applied in lipid emulsions. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:728-32.
- 102- Friedlich PS, Steinberg I, Fujitani A, deLemos RA. Renal tolerance with the use on intralipid-amphotericin B in low-birth-weight neonates. *Am J Perinatol* 1997; 14:377-83.
- 103- Schoffski P, Freund M, Wunder R, Petersen D, Kohne CH, Hecker H et al. Safety and toxicity of amphotericin B in glucose 5% or intralipid 20% in neutropenic with pneumonia or fever of unknown origin: randomised study. *Br Med J* 1998; 317:379-84.
- 104- Nath CE, Shaw PJ, Gunning R, McLachlan AJ, Earl JW. Amphotericin B in children with malignant disease: a comparison of the toxicities and pharmacokinetics of amphotericin B administered in dextrose versus lipid emulsion. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1417-23.

-
- 105- Nucci M, Loureiro M, Silveira F, Casali AR, Bouzas LF, Velasco E et al. Comparison of the toxicity of amphotericin B in 5% dextrose with that of amphotericin B in fat emulsion in a randomized trial with cancer patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1445-8.
- 106- Meunier-Carpentier F. New methods for delivery of antifungal agents. *Rev Infect Dis* 1989;11:S1605-12.
- 107- Cirujeda C, Juárez JC, Sabin P. Anfotericina B inhalada e intranasal. *El Farmaceúto Hospitales* 1994;51:36-40. Nota de redacción en: *El Farmaceúto Hospitales* 1994;53:50.
- 108- Chow HH, Cai Y, Mayersohn M. Disposition kinetics of amphotericin B in rats.
The influence of dose. *Drug Metab Disposition* 1992;20:432-5.
- 109- Kirschenbaum BE, Latiolais CJ: *Injectable medications-a guide to stability and reconstitution*. McMahon Group, New York, NY, 1993.
- 110- Bonner DP, Mechlinski W, Schaffner CP. Stability studies with amphotericin B and amphotericin B methyl ester. *J Antibiotics* 1975;28:132-5.
- 111- Ettinger NA, Trulock EP. Pulmonary considerations of organ transplantation. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:433-51.
- 112- Maurer JR, Tullis DE, Grossman RF, Vellend H, Winton TL, Patterson GA. Infectious complications following isolated lung transplantation. *Chest* 1992; 101:1056-59.
- 113- Paya CV. Fungal infections in solid-organ transplantation. *Clin Infect Dis*

- 1993; 16:677-88.
- 114- Paradis I, Yousem S, Griffith B. Airway Obstruction and Bronchiolitis Obliterans after lung transplantation. *Clinics Chest Med* 1993; 14:761-4.
- 115- Roman A, Gavaldá j, Bravo C, Montané M, Monforte V, Murio C et al. Prophylaxis with amphotericin B nebulized and ganciclovir (DHPG) in lung transplant patients. Annual Congress of European Respiratory Society (E.R.S.). Niza, 1994. (Abstract)
- 116- Diot P, Rivoire B, Le Pape A, Lemarie E, Dire D, Furet Y et al. Deposition of amphotericin B aerosols in pulmonary aspergilloma. *Eur Respir J* 1995;8:1263-8
- 117- Roth C, Gebhart J, Just-Nubling G, von Eisenhart-Rothe B, Beinbauer-Reeb I. Characterization of amphotericin B aerosols for inhalation treatment of pulmonary aspergillosis. *Infection* 1996;24:354-60.
- 118- Koizumi T, Kubo K, Kaneki T, Hanaoka M, Hayano T, Miyahara T et al. Pharmacokinetic evaluation of amphotericin B in lung tissue: lung lymph distribution after intravenous injection and airspace distribution after aerosolization and inhalation of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1597-600.
- 119- Hülsewede JW, Dermoumi H. Comparison of high-performance liquid chromatography and bioassay of amphotericin B in serum. *Mycoses* 1994;37:17-21.
- 120- Granich GG, Kobayashi GS, Krogstad DJ. Sensitive high-pressure liquid chromatography assay for amphotericin B which incorporates an internal standard. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;29:584-8.

-
- 121- Nilsson-Ehle I, Yoshikawa TT, Edwards JE, Schotz MC, Guze LB. Quantitation of amphotericin B with use of high-pressure liquid chromatography. *J Infect Dis* 1977;135:414-22.
- 122- Mayhew JW, Fiore C, Murray T, Barza M. An internally-standardized assay for amphotericin B in tissue and plasma. *J Chromatogr* 1983;274:271-9.
- 123- Golas CL, Prober CG, MacLeod SM, Soldin SJ. Measurement of amphotericin B in serum or plasma by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1983;278:387-95.
- 124- Bach PR. Quantitative extraction of amphotericin B from serum and determination by high-pressure liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;26:314-7.
- 125- Margosis M, Aszalos A. Quantitation of amphotericin B by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J Pharm Sci* 1984;73:835-8.
- 126- Leclercq M, Fouillit M, Panteix G, Guinet R. Reproducible measurement of amphotericin B in serum by high performance liquid chromatography in alkaline buffer. *J Chromatogr* 1985;337:423-8.
- 127- Kobayashi K, Sakoguchi T, Fujiwara K, Taniuchi K, Khori K, Mate J. Determination of amphotericin B in human serum by a high performance liquid chromatography method. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1986;34:5161-5.
- 128- Kobayashi K, Sakoguchi T, Fujiwara K, Taniuchi K, Khori K, Mate J. High-performance liquid chromatography determination of amphotericin B in human urine. *J Chromatogr* 1987;417:439-46.
- 129- Brassinne C, Laduron C, Coune A, Sculier JP, Hollaert C, Collette N et al. High-performance liquid chromatographic determination of amphotericin B in human serum. *J Chromatogr* 1987;419:401-7.

-
- 130- Hosotsubo H, Takezawa J, Taenaka N, Hosotsubo K, Yoshiya I. Rapid determination of amphotericin B levels in serum by high performance liquid chromatography without interference by bilirubin. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:1103-5.
- 131- Hosotsubo H, Hosotsubo K. Improved high-performance liquid chromatography determination of amphotericin B in human serum and plasma. *J Pharm Biomed Anal* 1989;7:975-9.
- 132- Janknecht R, Paulissen A, Hooymans PM, Lohman JJHM, Hermens WAJJ. Stability of amphotericin B in CAPD fluid. *Peritoneal Dialysis International* 1990;10:287-9.
- 133- Olsen SJ, Swerdel MR, Blue B, Clark JM, Bonner DP. Tissue distribution of amphotericin B lipid complex in laboratory animals. *J Pharm* 1991;43:831-5.
- 134- Sanders SW, Buchi KN, Goddard MS, Lang JK, Tolman KG. Single-dose pharmacokinetics and tolerance of a cholesteryl sulfate complex of amphotericin B administered to healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1029-34.
- 135- Wang H, Smith PC, Anderson KL. High-performance liquid chromatographic determination of amphotericin B in plasma, blood, urine and tissues for pharmacokinetic and tissue distribution studies. *J Chromatogr* 1992;579:259-68.
- 136- Lacroix C, Wojciechowski F, Danger P. Simultaneous determination of itraconazole, hydroxy-itraconazole and amphotericin B in human plasma by HPLC with photodiode array detection. *Ann Biol Clin* 1995;53:293-7.
- 137- Liu H, Davoudi H, Last T. Determination of amphotericin B in cerebrospinal fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J Pharm Biomed*

- Anal 1995;13:1395-1400.
- 138- NG TK, Chan RC, Adeyemi-Doro FA, Cheung SW, Cheng AF. Rapid high performance liquid chromatographic assay for antigungal agents in human sera. J Antimicrob Chemother 1996;37:465-72.
- 139- Alak A, Moy S, Bekersky I. A high-performance liquid chromatographic assay for the determination of amphotericin B serum concentrations after the administration of Ambisome, a liposomal amphotericin B formulation. Ther Drug Monit 1996;18:604-9.
- 140- Lambros MP, Abbas SA, Bourne DW. New high-performance liquid chromatographic method for amphotericin B analysis using an internal standard. J chromatogr 1996;685:135-40.
- 141- Wilkinson JM, McDonald C, Parkin JE, Sunderland VB. A high-performance liquid-chromatographic assay for amphotericin B in a hydrophilic colloidal paste base. J Pharm Biomed Anal 1998;17:751-5.
- 142- Echevarria I, Barturen C, Renedo MJ, Dios-Vieitez MC. High-performance liquid chromatographic determination of amphotericin B in plasma and tissue. Application to pharmacokinetic and tissue distribution studies in rats. J Chromatogr A 1998;819:171-6.
- 143- Sabin P, Monterde J, Cardona D, Lorente L, Pastor C. Incompatibilidad entre medicamentos y mezclas de nutrición parenteral. Estudio preliminar. Farmacia Clínica 1985;2:162-70.
- 144- Lachman L, DeLuca P, Akers MJ. Kinetics principles and stability testing. 3^a ed. Theoru and Practice of Industrial Pharmacy. En: Lachman L, Lieberman HA, Kaning JL, (eds). Philadelphia, Pa: Lea and Febiger;1986. p.760-803.

-
- 145- Ayestarán A, López RM, Montoro JB, Estíbaliz A, Pou L, Julia A et al. Pharmacokinetics of conventional formulation versus fat emulsion formulation of amphotericin B in a group of patients with neutropenia. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:609-12.
- 146- Juárez JC, López RM, Hueto M, Sabin P, Pou L. Stability of amphotericin B in water solution for inhalation. *Eur Hosp Pharm* 1997;3:59-60,65.
- 147- Monforte V, Román A, Gavaldá L, López R, Pou L, Bravo C et al. Farmacocinética de la anfotericina B nebulizada en secreciones respiratorias en el trasplante pulmonar. XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. Madrid, mayo 1999. (Abstract)
- 148- Monforte V, Román A, Gavaldá J, López R, Pou L, Bravo C et al. Pharmacokinetics of nebulized amphotericin-B in respiratory samples of lung transplanted patients. E.R.S. annual congress. Madrid, october 1999. (Abstract).
- 149- Román A, Monforte V, Gavaldá J, López R, Pou L, Simó M et al. Pharmacokinetics and distribution of nebulized amphotericin B (n-Amp) in lung transplantation. International Society for Heart and Lung Transplantation. 20th Annual Meeting and Scientific Sessions. Osaka, Japan, april 2000. (Comunicación oral).
- 150- Gavaldá J, Monforte V, Román A, Bravo C, Soriano V, Agudé S et al. Farmacocinética y distribución de la anfotericina B nebulizada en el trasplante de pulmón. IX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Santiago de Compostela, mayo de 2000. (Abstract).