

Estabilidad y actividad *in vitro* de voriconazol en colirio a una concentración de 3 µg/mL

B. Isla Tejera, C. Garzas Martín de Almagro, M. Cárdenas Aranzana, I. Pérez Rodrigo, M. D. Aumente Rubio, R. Gordillo Sánchez¹

Servicio de Farmacia Hospitalaria. ¹Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba

Resumen

Objetivo: Evaluar la estabilidad y actividad de un colirio de voriconazol 3 µg/mL, preparado para su uso en endoftalmítis fúngicas resistentes a anfotericina B y fluconazol.

Método: Se analizaron la estabilidad (concentración mediante espectrofotometría-UV; pH, osmolaridad y aparición de partículas) y la esterilidad bajo condiciones de conservación diferentes: temperatura ambiente (22-24 °C) o refrigerado (2-8 °C) y la eficacia *in vitro* del preparado, mediante el método estándar del *Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards* durante un periodo de 30 días.

Resultados: Las concentraciones de voriconazol se encontraron dentro de los márgenes permitidos por la *United States Pharmacopeia* (90-115%). El pH (ambiente 6,96-7,60; refrigerado: 6,84-7,21) y la osmolaridad (ambiente: 265-284 mOsm/l; refrigerado: 270-285 mOsm/l) se mantuvieron en los intervalos fisiológicos para el ojo, a lo largo de todo el estudio en las dos condiciones analizadas. La actividad antifúngica del colirio permaneció estable durante las tres primeras semanas.

Conclusiones: El colirio preparado de voriconazol 3 µg/mL permanece estable, estéril y con plena actividad antifúngica durante 21 días cuando se almacena tanto a temperatura ambiente como en refrigeración.

Palabras clave: Colirio. Estabilidad. Voriconazol. Endoftalmítis.

Summary

Objective: To assess the stability and activity of voriconazole 3 µg/mL eyedrops as prepared for use against amphotericin B- and fluconazole-resistant fungal endophthalmitis.

Method: Stability (concentration using UV-spectrophotometry; pH, osmolarity, and particle formation) and sterility were analyzed under various preservation conditions – room temperature (22-24 °C) or refrigerated (2-8 °C). The preparation's *in vitro* efficacy was analyzed using the standard *National Committee for Clinical Laboratory Standards* method for 30 days.

Results: Voriconazole concentrations were found to be within limits allowed by the *United States Pharmacopeia* (90-115%). pH (room temperature: 6.96-7.60; refrigerated: 6.84-7.21) and osmolarity (room temperature: 265-284 mOsm/l; refrigerated: 270-285 mOsm/l) remained within eye physiological ranges throughout the study under the analyzed conditions. The preparation's antifungal activity remained stable during the first three weeks.

Conclusions: The voriconazole 3 µg/mL eyewash preparation remained stable, sterile and with full antifungal activity for 21 days when stored both at room temperature and under refrigeration conditions.

Key words: Eyedrops. Stability. Voriconazole. Endophthalmitis.

Isla Tejera B, Garzas Martín de Almagro C, Cárdenas Aranzana M, Pérez Rodrigo I, Aumente Rubio MD, Gordillo Sánchez R. Estabilidad y actividad *in vitro* de voriconazol en colirio a una concentración de 3 µg/mL. *Farm Hosp* 2005; 29: 331-334.

Recibido: 04-05-2005
Aceptado: 03-10-2005

Correspondencia: B. Isla Tejera. Servicio de Farmacia Hospitalaria. Hospital Universitario Reina Sofía. Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14004 Córdoba. Fax: 957 701 04 81. e-mail: beatrizislatj@hotmail.com.

INTRODUCCIÓN

La endoftalmítis fúngica, aunque es poco común, continúa siendo un problema oftalmológico grave, en parte, por las limitaciones existentes para disponer de tratamientos potentes con acción local¹. Hasta hace pocos años, la administración intravítrea de anfotericina B con o sin fluconazol parenteral ha sido la primera elección terapéutica, pero se han descrito resistencias en ambos casos² y falta de cobertura microbiológica sufi-

ciente en el caso del fluconazol³. El voriconazol es un nuevo antifúngico triazólico que ha mostrado tener mayor actividad que el fluconazol, presentando concentraciones mínimas inhibitorias de 10 a 50 veces menores que este en cepas sensibles. Además es útil frente a cepas de *Aspergillus spp.* resistentes al fluconazol y en los casos de *Fusarium spp.*, *Acremonium*, *Scedosporium inflatum*, *Trichosporon spp.* y *Pseudallescheria boydii*, que presentan resistencia habitual a fluconazol, itraconazol y anfotericina B⁴. Existen trabajos que muestran la eficacia de este nuevo fármaco por vía oral y/o parenteral en el tratamiento de las endoftalmitis fúngicas⁵. Recientemente, García y cols. han comunicado el método de formulación de un colirio de voriconazol 3 µg/mL para el tratamiento de un caso de endoftalmitis por el hongo dematiáceo *Natrasia manguiiferae*, que se mostró resistente a itraconazol y anfotericina B⁶. Estos autores, según la bibliografía proporcionada por el laboratorio proveedor, dan una caducidad al preparado de 24 horas conservado entre 4-8 °C.

Esto supone la utilización diaria de un vial para preparar la solución final de antifúngico, lo que origina unos costes estimados de 11.754 € para un tratamiento aproximado de 8 semanas. A esto hay que añadir la carga extra de trabajo que su elaboración implica y la posible falta de adherencia al tratamiento debido a la incomodidad que para el paciente supondría acudir cada día al servicio de farmacia para recoger la medicación. Todo ello nos llevó a plantear la realización de un trabajo experimental para conocer la caducidad real del preparado.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la estabilidad y actividad *in vitro* de un colirio de voriconazol 3 µg/mL para proporcionar una fecha de caducidad y condiciones de conservación más exactas con el fin de reducir costes, hacer más cómodo el cumplimiento terapéutico a los pacientes y disminuir la carga de trabajo que conlleva la preparación diaria del mismo.

MÉTODOS

Elaboración del colirio

Se prepararon 6 lotes de colirio de voriconazol 3 µg/mL bajo las mismas condiciones, en cabina de flujo laminar horizontal a partir de un vial comercial de voriconazol 200 mg liofilizado Vfend® (Pfizer™ Limited, Sandwich, Kent, UK), que se reconstituyeron con 19 mL de agua para inyección, con lo que se obtiene una solución de 10 mg/mL. A continuación se pasaron 0,5 mL del vial reconstituido por el cono de la aguja a una jeringa de 50 mL, completando esta con solución al 0,9% de NaCl y se tomó una muestra de 0,3 mL. Por último, se añadieron 9,7 mL de una solución para irrigación estéril BSS a los 0,3 mL de voriconazol. Este procedimiento ha sido modificado con respecto al descrito por García y cols^{6,7}.

Condiciones de estudio

Se determinó la estabilidad (concentración, pH, osmolaridad y presencia de partículas) y la esterilidad durante un periodo de 30 días bajo dos condiciones de conservación diferentes: temperatura ambiente (22-24 °C) o refrigerado (2-8 °C).

Control de estabilidad

—*Determinación de la concentración.* Se analizaron las concentraciones de voriconazol utilizando un espectrofotómetro de UV-visible (DV® 640 Spectrophotometer, Beckman™ Instruments Inc., Palo Alto, Cal, USA). Se realizaron determinaciones por triplicado a 256 nm, longitud de onda a la que se observó máxima absorbancia tras un barrido en UV-visible. La concentración de voriconazol se calculó a partir de la extrapolación en una curva patrón construida con concentraciones crecientes comprendidas en un rango de 0-120 µg/mL, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,9986 ($p < 0,0001$); con un coeficiente de variación intradía e interdía de 1,79 y 3,4% respectivamente, para una concentración de 2,5 µg/mL. El límite de detección de la técnica fue de 1,58 µg/mL.

—*Control del pH.* Se realizaron mediciones por duplicado del pH (Crison, Micro pH 2001, Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain) cada 48 h en ambas condiciones de almacenamiento durante los 30 días del estudio.

—*Control de osmolaridad.* Cada 48 horas se midió la osmolaridad de las muestras del colirio por duplicado (Osmo Station TM OM-6050 Menarini Diagnostic, A. Menarini Industrie Farmaceutiche Riunite s.r.l. Firenze, Italy) en ambas condiciones de almacenamiento durante los 30 días del estudio.

—*Presencia de partículas.* La presencia de partículas se evaluó mediante la inspección visual diaria de la posible presencia de agregados en las soluciones de estudio.

Control de esterilidad

Con la finalidad de comprobar la esterilidad de la mezcla se realizó periódicamente el control microbiológico de las soluciones. Se realizaron siembras de las soluciones de voriconazol en Mc Conkey, caldo tioglicolato y en placas de agar sangre para recuento cuantitativo cada 48 h, incubándose en estufa a 37 °C durante 7 días. Para el cultivo de hongos se sembraron las muestras en placas de agar Sabouraud-Cloranfenicol, incubándose a temperatura ambiente y en estufa a 37 °C durante 30 días.

Estudio de actividad *in vitro*

Se determinaron las CMIs frente a voriconazol para hongos levaduriformes mediante el método estándar

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (documento M27-A2)⁸, usando polvo valorado (Pfizer™ Inc. Central Research Division, Grotton, Conn) y una solución madre obtenida a partir del colirio. Se utilizaron 24 cepas de *Candida* (9 *C. albicans*, 8 *C. parapsilosis*, 4 *C. glabrata*, 2 *C. tropicalis* y 1 *C. krusei*). La determinación de la concentración mínima inhibitoria CMI se realizó mediante microdilución. Se han repetido estas mediciones en los días 0, 3, 7, 9, 16, 21 y 30 para evaluar la actividad antifúngica. Las lecturas se realizaron a las 48 h y la incubación a 35 °C. Como control de calidad se usaron las cepas *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Análisis de los datos

Los resultados se expresan como intervalo (valores inicial y final) o como media ± desviación estándar. Se utilizó la prueba de correlación de Pearson para comprobar el grado de ajuste de los datos de absorbancia a una recta patrón. Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS versión 11.0 para Windows. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de concentración de cada muestra en ambos tipos de condiciones de almacenamiento se consideraron como relativos a los obtenidos a tiempo cero (día de la elaboración del colirio) que supone el 100%. Dichos valores siempre estuvieron dentro de los márgenes de validez de la *United States Pharmacopeia* (USP) (90-115%)⁹ como se muestra en la figura 1. Dado que nosotros partíamos de una solución homogénea con una sola sustancia activa (a diferencia de las muestras biológicas como humor vítreo, plasma, etc., a las que hacen referencia otros trabajos publicados)¹⁰, consideramos que no era necesario el uso de una técnica cromatográfica como la

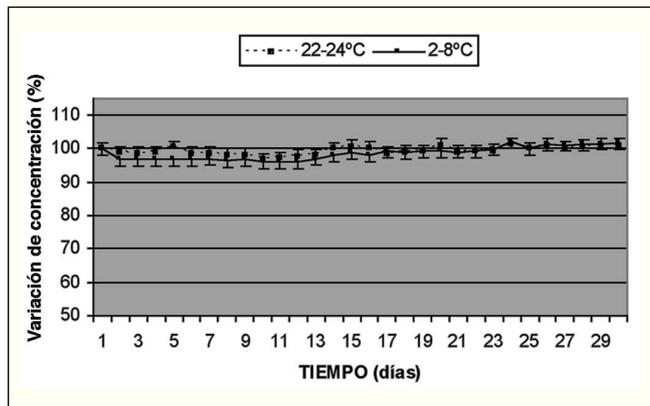


Fig. 1.- Evolución porcentual de las concentraciones de voriconazol en las diferentes condiciones de conservación.

HPLC. Por este motivo utilizamos directamente la espectroscopía de UV-visible como método de cuantificación de las concentraciones de voriconazol.

Se considera como totalmente indolora la aplicación corriente por instilación de soluciones con pH comprendido entre 7,3 y 9,7, siendo todavía aceptables para el ojo no lesionado las que tengan pH entre 5,5 y 11,4¹¹. En nuestro caso, se observó, a partir de la tercera semana, que los valores de pH presentaban una tendencia descendente en las muestras conservadas en frío y ascendente en las de temperatura ambiente, aunque permanecieron siempre dentro del intervalo que nos asegura la ausencia de efectos irritantes (Fig. 2).

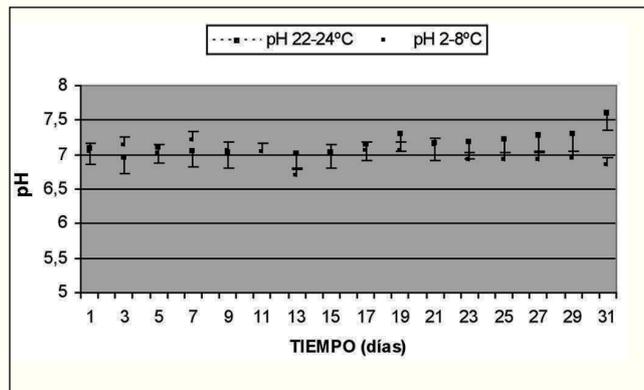


Fig. 2.- Variación de los valores de pH durante el periodo de estudio en las diferentes condiciones de conservación.

El ojo tiene un margen de tolerancia a la tonicidad bastante elevado, dentro del cual no se produce influencia, o sólo muy pequeñas, fisiológicamente aceptables. Así, las soluciones con una tonicidad del orden de 217-544 mOsm/l resultan indoloras y no producen lagrimeo (ni eliminación, por lo tanto, del medicamento aplicado)¹¹. Los valores de osmolaridad de nuestro preparado se mantuvieron dentro de este rango, observando una tendencia descendente en ambas condiciones de conservación (Fig. 3).

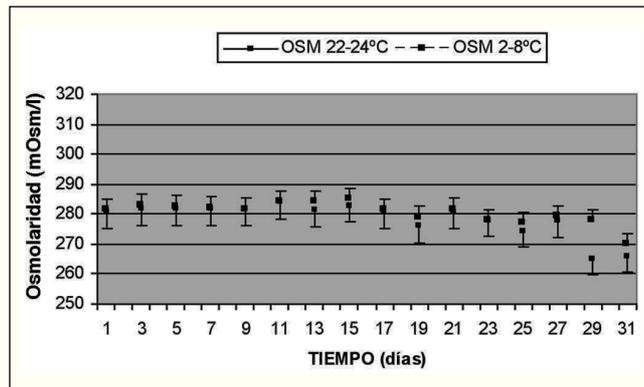


Fig. 3.- Variación de los valores de Osm durante el periodo de estudio en las diferentes condiciones de conservación.

Tabla I. Intervalos de CMI₅₀ y CMI₉₀ para voriconazol frente a las distintas especies ensayadas de hongos patógenos en las 4 semanas de estudio

Hongo	CMI			Grado de acuerdo			
	Rango CMI (mg/mL)	Rango CMI ₅₀ (mg/mL)	Rango CMI ₉₀ (mg/mL)	1ª sem.	2ª sem.	3ª sem.	4ª sem.
<i>C. albicans</i>	0,03->16	0,03-0,12	0,03-0,12	100%	100%	100%	56%
<i>C. parapsilosis</i>	0,03-0,25	0,03-0,12	0,03-0,12	100%	100%	100%	88%
<i>C. glabrata</i>	0,12-0,5	0,06-0,5	0,06-0,5	100%	100%	100%	100%
<i>C. tropicalis</i>	0,03-1	0,03-0,25	0,03-1	100%	100%	100%	100%
<i>C. krusei</i>	0,25-0,5	0,25-0,5	0,25-0,5	100%	100%	100%	100%

El control visual realizado diariamente constató la ausencia de partículas en el preparado durante todo el periodo en las distintas formas de almacenamiento.

Pese a que las condiciones de trabajo fueron asépticas, se quiso comprobar la continuidad de la esterilidad de la muestra a lo largo del periodo de estudio, no apreciándose en ninguna de las dos condiciones de conservación crecimiento bacteriano ni fúngico.

En la tabla I se muestran los rangos de los valores absolutos de las CMI obtenidos en las 4 semanas de estudio para cada especie, siendo iguales tanto para polvo valorado como para solución madre del colirio. El grado de acuerdo, utilizando ambos métodos para cada una de las especies y en cada semana (1ª, 2ª, 3ª y 4ª), está recogido en dicha tabla. La actividad antifúngica del preparado se mantuvo estable en las tres primeras semanas de este periodo para las especies más representativas clínicamente (*C. albicans* y *C. parapsilosis*).

Nuestro trabajo establece que el colirio de voriconazol 3 µg/mL permanece con estabilidad fisicoquímica durante las 4 semanas del estudio para ambas condiciones de

conservación. Sin embargo, sólo se demostró la actividad *in vitro* en las tres primeras semanas desde la preparación del colirio, por lo que no debería recomendarse su uso a partir de esta fecha. Estos resultados permitirían ampliar la fecha de caducidad establecida anteriormente en 24 horas por García y cols. De este modo, se podría preparar dicha formulación con un intervalo de tiempo más amplio, lo que supondría un beneficio económico importante, al minimizar los costes de su elaboración. El gasto del nuevo esquema de preparación sería 522,4 € para una duración estimada de 8 semanas de tratamiento, lo que conlleva un ahorro total de 11.231,6 €. Además, se facilitaría al enfermo la adherencia al tratamiento y disminuiría la carga asistencial para la sección encargada de su elaboración.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a Juan Ruano y Carmen Marín su contribución en los análisis de laboratorio.

Bibliografía

1. Doft BH, Barza M. Optimal management of postoperative endophthalmitis and results of the endophthalmitis vitrectomy study. *Curr Opin Ophthalmol* 1996; 7: 84-94.
2. Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Anphoterin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 308-29.
3. Christmas NJ, Smiddy WE. Vitrectomy and systemic fluconazole for the treatment of endogenous fungal endophthalmitis. *Ophthalmic Surg Lasers* 1996; 27: 1012-8.
4. Ghannoum MA, Kuhn DM. Voriconazole-better chances for patients with invasive mycoses. *Eur J Med Res* 2002; 7: 242-56.
5. Breit SM, Hariprasad SM, Mieler WF, Shah GK, Mills MD, Grand M. Management of endogenous fungal endophthalmitis with voriconazole and caspofungin. *Am J Ophthalmol* 2005; 139: 135-40.
6. García V, León J, Nájera MD, Plaza J, Iranzo MD, Ventura M. Formulación de un colirio e inyección intravítrea de Voriconazol. *Farm Hosp* 2000; 24: 20.
7. Alonso Herreros JM. Preparación de medicamentos y formulación magistral para oftalmología. Madrid: Díaz de Santos (Ed.), 2003.
8. Espinel-Ingroff A, Boyle K, Sheehan DJ. In vitro antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: review of the literature. *Mycopathologia* 2001; 150: 101-5.
9. U.S.P. XXI edition: 829.
10. Keevil BG, Newman S, Lockhart S, Howard SJ, Moore CB, Denning DW. Validation of an assay for voriconazole in serum samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2004; 26: 650-7.
11. Voig R, Bornschein M. Tratado de tecnología farmacéutica. Tercera edición. Zaragoza: Acribia (Ed.), 1982.