GABRIELA CAMPOS DE OLIVEIRA FILGUEIRA

Influência do diabetes *mellitus* tipo 2 na farmacocinética da nifedipina
em gestantes hipertensas

Dissertação de mestrado apresentada ao
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para
obtenção do Título de Mestre em Biologia da
Reprodução.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli

Ribeirão Preto
2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Filgueira, Gabriela Campos de Oliveira

Influência do diabetes *mellitus* tipo 2 na farmacocinética da nifedipina em gestantes hipertensas.

97p.: il; 30 cm.

Dissertação para título de Mestre apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientador: Cavalli, Ricardo Carvalho.

Palavras chave: 1. Nifedipina. 2. Diabetes *mellitus* tipo 2. 3. Hipertensão. 4. Farmacocinética. 5. Transferência placentária

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gabriela Campos de Oliveira Filgueira

Influência do diabetes *mellitus* tipo 2 na farmacocinética da nifedipina em gestantes hipertensas

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Biologia da Reprodução.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Ao meu marido **Osmany**, companheiro de todos os momentos, pelo apoio e amor incondicionais. Obrigada pela paciência e pelo incentivo para realizar esta pesquisa, contribuições fundamentais para que ela fosse realizada com êxito. Sem você esta conquista não seria possível, mas se possível fosse, não valeria à pena!*

*Aos meus pais **Jacy e Gilza**, por sempre abdicarem de seus sonhos para que os meus fossem realizados, por entenderem a minha ausência e me ensinarem a trilhar meus caminhos com honestidade, competência e dedicação.*

*Às minhas irmãs **Jaqueline e Cássia**, pelo amor, amizade, carinho, cumplicidade e por me proporcionarem momentos de grande alegria.*

*Aos meus avós **Geraldo, Gleides e Maria**, que muitas vezes sem entenderem o que eu dizia sobre a minha pesquisa tiveram paciência de escutar as minhas explicações e se sentirem felizes por mim. Ao meu avô **Augusto** que intercede por mim junto a Deus e se alegra com minhas conquistas!*

Agradecimento especial

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli, que me acolheu com tanto carinho, por seus ensinamentos, orientação, conselhos, incentivos, por sua amizade e fundamentalmente por acreditar em minha capacidade de desenvolver esta pesquisa.

À Prof. Dra. Vera Lucia Lanchote, por me acolher em seu laboratório com tanta ternura, por seu auxílio essencial no desenvolvimento desta pesquisa, pelo apoio, orientação, amizade e também pela disponibilidade de participação na banca examinadora.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua presença, que sempre me ilumina, abençoa e capacita para seguir os caminhos na direção correta.

À Prof. Dra. Elaine Christine Dantas Moisés, pelos ensinamentos, carinho, por se tornar uma grande amiga, pela ajuda na seleção de pacientes e também pela disponibilidade de participação na banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Geraldo Duarte, exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa, pelo carinho, pela disposição em me auxiliar sempre, pelo seu ombro amigo, por sempre saber as palavras adequadas a me dizer e pela valiosa contribuição em meu exame de qualificação para o Mestrado.

À Prof. Dra. Natália Valadares de Moraes, por me acolher no laboratório quando comecei o meu estágio, por todos os ensinamentos e amizade e pela importante contribuição em meu exame de qualificação para o Mestrado.

À Dra. Maria Paula Marques Pereira, funcionária do Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP, por estar sempre disposta a me auxiliar no desenvolvimento desta pesquisa, por seus ensinamentos, carinho, competência, amizade, pelas longas conversas e risadas.

Ao Sr. Natalino Bocardó, funcionário do Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP, por seu apoio, amizade, companheirismo e alegria constantes, que fizeram com que meus dias no laboratório fossem prazerosos e felizes.

À Dra. Adriana Rocha, funcionária do Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP, por sua ternura, competência, dedicação, amizade e por todo o auxílio científico durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Augusto Martins e à Dra. Flávia Magalhães, pelo carinho, amizade e por todos os exames de ultrassom 3d que realizaram com tanta dedicação.

À Dra. Ana Carolina Calderon, Dr. Caio Prado, Dr. Rafael Yano, por me fazerem sentir parte da equipe dos ambulatórios de gestação de alto risco e pelo grande apoio e auxílio na seleção das pacientes.

A todos os meus amigos do grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP e do grupo de pesquisa do

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP: Ana Leonor Godoy, Carolina Pinto, Daniel Neves, Daniela Miarelli, Diego Cusinato, Francine Attie, Gabriel Tavares, Giovana Lanchoti, Glauco Nardotto, Jackeline Rangel, João Paulo Ximenez, Larissa Matheus, Leandro Pippa, Leonardo Pinto, Marília Souza, Milena Oliveira, Michelle Rangel, Natália Antunes, Roberta Cestari, Rodrigo Metzker, Tawana Bertagnolli, pela troca de experiências e conhecimentos pessoais e profissionais, pela amizade e precioso apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (DGO-FMRP-USP): docentes, médicos assistentes, médicos residentes e equipe de enfermagem do centro obstétrico, dos ambulatórios de gestação de alto risco, da enfermaria de gestantes e do banco de leite do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, pela contribuição inenarrável no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP: Adelaide, Gabriela Sica, Ilza Mazzocato, Michelle Murari, Reinaldo Tavares, Ricardo Perussi, Rosane Casula, Suelen Soares, por torcerem sempre para o meu crescimento, pela amizade e disposição em me ajudar e por todos os momentos agradáveis e pelo carinho em nosso convívio diário.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pelo comprometimento e competência no cuidado das pacientes e coleta de amostras.

Ao Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli, pelo apoio e incentivo em meu crescimento como mestranda e futura docente, por sua dedicada supervisão no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) na disciplina de Farmacologia da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto.

A todos os professores e funcionários da Universidade de Uberaba (UNIUBE), base do meu desenvolvimento profissional.

Aos meus cunhados, Welerson e Rafael, a todos os meus tios, primos, afilhados e a família do meu marido, pelo carinho, incentivo, por sempre se orgulharem e acreditarem em minha capacidade.

Às pacientes que participaram desta pesquisa, pela confiança em mim depositada, por se tornarem mais que pacientes, amigas, que lembrarei por toda a vida.

Ao Setor de Obstetrícia do DGO-FMRP-USP e ao Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por tornarem possível a realização desta pesquisa.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da FMRP-USP, pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço também aqueles que, embora não citados aqui por meu esquecimento, mas que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

“A verdade científica está onde deve estar, não onde queremos que esteja. Nosso dever de cientista e de cidadão é procurá-la de forma ética e humanizada, dispensando a esta tarefa todos os recursos materiais e intelectuais ao nosso alcance.”

Prof. Dr. Geraldo Duarte

RESUMO

FILGUEIRA, GCO. **Influência do diabetes *mellitus* tipo 2 na farmacocinética da nifedipina em gestantes hipertensas.** 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A nifedipina é uma dihidropiridina, antagonista de canal de cálcio utilizada no tratamento hipertensão arterial na gravidez. O presente estudo visa avaliar a influência do DM2 na farmacocinética da nifedipina em gestantes hipertensas. Foram avaliadas 12 gestantes hipertensas (grupo controle) e 10 gestantes hipertensas portadoras de DM 2 controlado (grupo DM), em uso de nifedipina retard (20 mg, 12/12 horas). A partir da 34ª semana de gestação foram coletadas amostras seriadas de sangue para a análise farmacocinética nos tempos zero, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660 e 720 minutos após a administração do medicamento. Na resolução da gravidez coletou-se sangue materno e fetal para determinar a taxa de transferência placentária da nifedipina. Foram coletadas também alíquotas de sangue do espaço intervilo e de líquido amniótico para a determinação da distribuição do fármaco nestes compartimentos. As concentrações de nifedipina em plasma e líquido amniótico foram analisadas por LC-MS/MS. Os parâmetros farmacocinéticos e de transferência placentária da nifedipina, reportados como mediana foram comparados usando o teste Mann-Whitney, com nível de significância fixado em $p < 0,05$. Os parâmetros encontrados para o grupo controle foram C_{max} 26,41 ng/mL; t_{max} 1,79h; AUC^{0-12} 235,99 ng.h/mL; Kel 0,16 h⁻¹; $t_{1/2}$ 4,34 h; Vd/F 560,96 L; Cl_T/F 84,77 L/h. Para o grupo DM, foram encontrados os seguintes parâmetros C_{max} 23,52 ng/mL; t_{max} 1,48h; AUC^{0-12} 202,23 ng.h/mL; Kel 0,14 h⁻¹; $t_{1/2}$ 5,00 h; Vd/F 609,40 L; Cl_T/F 98,94 L/h. As razões da concentração plasmática da nifedipina na veia umbilical, artéria umbilical, espaço intervilo e líquido amniótico pela concentração plasmática na veia materna foram para o grupo controle e para o grupo DM 0,53 e 0,44; 0,46 e 0,33; 0,78 e 0,87, respectivamente, e 0,05 para ambos os grupos. A razão da concentração plasmática da artéria umbilical pela veia umbilical foi 0,82 para o grupo controle e 0,88 para o grupo DM. Não houve influência do DM2 na farmacocinética e transferência placentária da nifedipina em gestantes hipertensas portadoras de diabetes controlado. O estudo sugere que o regime de dose da nifedipina não precisa ser modificado.

Palavras-chave: Nifedipina, diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão, farmacocinética, transferência placentária.

ABSTRACT

FILGUEIRA, GCO. **Influence of type 2 diabetes mellitus on pharmacokinetics of nifedipine in hypertensive pregnant women.** 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Nifedipine is a dihydropyridine calcium channel blocker used in the treatment of hypertension in pregnant women. The present study aims to evaluate the effect of T2DM on the pharmacokinetics of nifedipine in hypertensive pregnant women. 12 hypertensive pregnant women (control group) and 10 hypertensive pregnant women with controlled T2DM, using nifedipine retard (20 mg, 12/12h) were evaluated. From 34th week of gestation, serial blood samples were collected for pharmacokinetics analysis at times zero, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660 e 720 minutes after drug administration. At delivery, maternal blood, umbilical vein and umbilical artery were collected to determine the rate of placental transfer of nifedipine. Aliquots from placental intervillous space and amniotic fluid were also collected to determine the drug distribution in these compartments. The concentrations of nifedipine in plasma and amniotic fluid were analyzed by LC-MS/MS. Pharmacokinetics and transplacental transfer parameters of nifedipine, reported as median, were compared using Mann-Whitney test, with the level of significance set at $p < 0.05$. The parameters presented for control group were C_{max} 26.41 ng/mL; t_{max} 1.79h; AUC^{0-12} 235.99 ng.h/mL; Kel 0.16 h⁻¹; $t_{1/2}$ 4.34 h; Vd/F 560.96 L; Cl_T/F 84.77 L/h. For T2DM group the parameters presented were C_{max} 23.52 ng/mL; t_{max} 1.48h; AUC^{0-12} 202.23 ng.h/mL; Kel 0.14 h⁻¹; $t_{1/2}$ 5.00 h; Vd/F 609.40 L; Cl_T/F 98.94 L/h. The ratios of plasma concentration of nifedipine in umbilical vein, umbilical artery, intervillous space and amniotic fluid for plasma concentration of maternal vein for control group and T2DM group were 0.53 and 0.44; 0.46 and 0.33; 0.78 and 0.87, respectively, and 0.05 for both groups. The ratios of plasma concentration of umbilical artery and umbilical vein were 0.82 for control group and 0.88 for T2DM group. T2DM does not influence the pharmacokinetics of nifedipine in hypertensive pregnant women with controlled diabetes. The study suggests that the nifedipine dose regimen doesn't need to be modified.

Keywords: Nifedipine, type 2 diabetes mellitus, hypertension, pharmacokinetics, placental transfer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fórmulas estruturais da nifedipina e de seus metabólitos. Via metabólica da nifedipina em humanos. Rota sugerida. M-0, M-I e M-II: maiores metabólitos urinários. (Figura adaptada de BREIMER; SCHELLENS; SOONS, 1989).....	28
Figura 2:	Estrutura esquemática da placenta humana. Corte transversal do útero em uma gravidez no termo, mostrando feto ligado à placenta através do cordão umbilical. No esquema detalhado, estrutura de cotilédones, a unidade funcional da placenta é retratada (Figura adaptada de CECKOVA-NOVOTNA; PAVEK; STAUD 2006).....	30
Figura 3:	Protocolo clínico.....	37
Figura 4:	Gráfico da concentração plasmática e pressão arterial (PA) média <i>versus</i> tempo.....	49
Figura 5:	Espectro de massas do íon molecular protonado (A) e do íon produto (B) da nifedipina e do íon molecular protonado (C) e do íon produto (D) do padrão interno nitrendipina.....	51
Figura 6:	Cromatogramas referentes ao tempo de retenção da nifedipina em plasma (I) e líquido amniótico (II). (A) Plasma ou líquido amniótico branco, (B) plasma enriquecido com nifedipina 60 ng/mL ou líquido amniótico enriquecido com nifedipina 6 ng/mL, (C) plasma ou líquido amniótico enriquecidos com o padrão interno nitrendipina 50 ng/mL.....	52
Figura 7:	Curvas de concentração plasmática <i>versus</i> tempo da nifedipina no estado de equilíbrio obtidas na investigação de gestantes hipertensas do grupo controle (n=12) e do grupo DM (n=10),	

tratadas com dose múltipla de nifedipina retard, 20 mg/12h.....	56
Figura 8: Concentrações plasmáticas da nifedipina nos compartimentos materno-fetal em função do tempo para o grupo controle (n=12).....	59
Figura 9: Concentrações plasmáticas da nifedipina nos compartimentos materno-fetal em função do tempo para o grupo DM (n=10).....	59
Figura 10: Concentrações plasmáticas da nifedipina na veia materna e no líquido amniótico em função do tempo para o grupo controle (n=12).....	60
Figura 11: Concentrações plasmáticas da nifedipina na veia materna e no líquido amniótico em função do tempo para o grupo DM (n=8).....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Característica das pacientes investigadas.....	46
Tabela 2:	Parâmetros bioquímicos das gestantes investigadas.....	47
Tabela 3:	Parâmetros hematológicos das gestantes investigadas.....	38
Tabela 4:	Parâmetros glicêmicos das gestantes do grupo DM durante a coleta seriada de sangue no intervalo de dose da nifedipina.....	50
Tabela 5:	Características dos recém-nascidos das pacientes investigadas.....	50
Tabela 6:	Efeito matriz para a nifedipina em oito diferentes lotes de plasma humano e seis diferentes lotes de líquido amniótico.....	53
Tabela 7:	Parâmetros de validação do método de análise na nifedipina em plasma humano por LC-MS/MS.....	54
Tabela 8:	Parâmetros de validação do método de análise na nifedipina em líquido amniótico por LC-MS/MS.....	55
Tabela 9:	Parâmetros farmacocinéticos da nifedipina em gestantes hipertensas do grupo controle e do grupo DM.....	57
Tabela 10:	Transferência placentária da nifedipina e sua distribuição no líquido amniótico de pacientes dos grupos controle e DM.....	59
Tabela 11:	Comparação de métodos de análises de nifedipina nos últimos trabalhos descritos na literatura comparados com o presente estudo.....	64

Tabela 12:	Comparação de parâmetros farmacocinéticos de trabalhos da literatura comparados com o presente estudo.....	66
Tabela i:	Dados individuais das pacientes do grupo controle (n=12).....	88
Tabela ii:	Dados individuais das pacientes do grupo DM (n=10).....	88
Tabela iii:	Dados individuais dos parâmetros bioquímicos das gestantes do grupo controle (n=12).....	89
Tabela iv:	Dados individuais dos parâmetros bioquímicos das gestantes do grupo DM (n=10).....	90
Tabela v:	Dados individuais da avaliação da normalidade funcional do sistema hematológico das gestantes do grupo controle (n=12).....	91
Tabela vi:	Dados individuais da avaliação da normalidade funcional do sistema hematológico das gestantes do grupo DM (n=10).....	91
Tabela vii:	Parâmetros hemodinâmicos individuais das gestantes do grupo controle investigadas durante as 12 horas de internação para coleta seriada de sangue no intervalo de dose da nifedipina (n=12).....	92
Tabela viii:	Parâmetros hemodinâmicos individuais das gestantes do grupo DM investigadas durante as 12 horas de internação para coleta seriada de sangue no intervalo de dose da nifedipina (n=10).....	93
Tabela ix:	Parâmetros glicêmicos individuais das gestantes do grupo DM investigadas durante as 12 horas de internação para coleta seriada de sangue no intervalo de dose da nifedipina (n=10).....	93

Tabela x:	Características individuais dos recém-nascidos (RN) das pacientes do grupo controle (n=12).....	94
Tabela xi:	Características individuais dos recém-nascidos (RN) das pacientes do grupo DM (n=10).....	94
Tabela xii:	Dados individuais da farmacocinética da nifedipina em gestantes do grupo controle (n=12).....	95
Tabela xiii:	Dados individuais da farmacocinética da nifedipina em gestantes do grupo DM (n=10).....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: Alanina aminotransferase

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST: Aspartato aminotransferase

AU: Sangue da artéria umbilical

CEP: Comitê de ética em pesquisa

CQA: Controle de qualidade de alta concentração

CQB: Controle de qualidade de baixa concentração

CQD: Controle de qualidade de diluição

CQM: Controle de qualidade de média concentração

CV: Coeficiente de variação

CYP: Citocromo P450

DM: Diabetes *mellitus*

DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1

DM2: Diabetes *mellitus* tipo 2

DMG: Diabetes *mellitus* gestacional

EIV: Sangue do espaço intervilosso

EPR: Erro padrão relativo

FCFRP-USP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FMN: Fator de matriz normalizado por padrão interno

HCFMRP-USP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

IC 95%: Intervalo de confiança 95%

IG: Idade gestacional

IMC: Índice de massa corporal

LA: Líquido amniótico

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LC: Cromatografia líquida

LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas

LIQ: Limite inferior de quantificação

[M+H]⁺: Íon molecular protonado

M-0: Metabólito piridina

M-I e M-II: Maiores metabólitos urinários

MRM: Monitoramento de reações múltiplas

MS/MS: Espectrometria de massas

PA: Pressão arterial

P-gp: Glicoproteína-P

PI: Padrão interno

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

UGT: Uridina-difosfato-glicuronosil-transferases

UPC: Unidade de pesquisa clínica

VM: Sangue da veia materna

VU: Sangue da veia umbilical

v/v: volume/volume

γ-GT: Gama glutamil transferase

LISTA DE SÍMBOLOS

AUC: Área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo

Cl creatinina: *Clearance* de creatinina

Cl_T/F: *Clearance* total aparente

C_{max}: Concentração plasmática máxima

Kel: Constante de velocidade de eliminação

t_{1/2}: Meia-vida de eliminação

t_{max}: Tempo para alcançar C_{max}

Vd/F: Volume de distribuição aparente

®: Marca registrada

SUMÁRIO

1 Introdução.....	22
1.1 Hipertensão arterial crônica.....	23
1.2 Diabetes <i>mellitus</i>	24
1.3 Farmacocinética durante a gravidez.....	25
1.4 Farmacocinética da nifedipina.....	27
1.5 Transferência placentária.....	29
2 Justificativa.....	31
3 Objetivos.....	33
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 Pacientes e métodos.....	35
4.1 Aspectos éticos.....	36
4.2 Cálculo amostral e seleção de pacientes.....	36
4.3 Protocolo clínico.....	37
4.4 Métodos.....	38
4.4.1 Sistema de coleta de sangue materno, vasos umbilicais, espaço intervilo e líquido amniótico.....	38
4.4.2 Análise bioquímica no soro materno.....	39
4.4.3 Estimativa da função renal.....	39
4.4.4 Método laboratorial para determinação de nifedipina.....	39
4.4.4.1 Soluções padrão e reagentes.....	39
4.4.4.2 Análise cromatográfica.....	40
4.4.4.3 Preparo de amostras.....	41
4.4.5 Validação do método de análise da nifedipina em plasma e líquido amniótico.....	41
4.4.5.1 Efeito matriz.....	41
4.4.5.2 Linearidade.....	42
4.4.5.3 Precisão e exatidão.....	42
4.4.5.4 Estabilidade.....	43
4.4.6 Análise farmacocinética.....	44
4.4.7 Análise estatística.....	44
5 Resultados.....	45
5.1 Características das pacientes investigadas.....	46

5.2 Característica dos recém-nascidos.....	50
5.3 Análise da nifedipina em plasma e líquido amniótico.....	51
5.4 Farmacocinética da nifedipina em gestantes hipertensas.....	56
5.5 Distribuição transplacentária e no líquido amniótico da nifedipina.....	57
6 Discussão.....	61
7 Conclusões.....	72
8 Referências bibliográficas.....	74
Anexos.....	82
Apêndices.....	84

1.1 Hipertensão Arterial Crônica

A hipertensão é uma das complicações mais comuns durante a gestação e uma das principais causas de morbimortalidade materna e fetal em todo o mundo (BARRA et al., 2012; GIANNUBILO et al., 2012; SIBAI, 2012). Hipertensão na gravidez pode refletir a hipertensão crônica pré-existente, definida como uma pressão sanguínea maior ou igual a 140/90 mmHg, em duas aferições com intervalo de 4 ou 6 horas, registrada antes da gestação ou verificada antes da 20ª semana de gravidez (BETHESDA, 2000; PODYMOW; AUGUST, 2011; SOLOMON; SEELY, 2011; KATTAH & GAROVIC, 2013; *AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS*, 2013).

A hipertensão arterial crônica é uma condição clínica comum na gravidez e sua prevalência está aumentando devido ao aumento do número de gestantes obesas e da idade materna avançada (BATEMAN et al., 2012).

Cerca de 25% dos casos de mulheres com hipertensão arterial crônica durante gravidez têm um risco aumentado para exacerbação da hipertensão e/ou pré-eclâmpsia (SOLOMON; SEELY, 2011). O risco depende da gravidade da hipertensão, presença de condições médicas associadas como obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2 e doença renal (SIBAI, 2012).

O tratamento da hipertensão em gestantes tem o objetivo de prevenir potenciais complicações cerebrovasculares e cardiovasculares como encefalopatia, hemorragia e insuficiência cardíaca congestiva e, ainda, possíveis complicações fetais pelo descolamento prematuro de placenta (PODYMOW; AUGUST, 2011; SIBAI, 2012; GIANNUBILO et al., 2012).

Os fármacos anti-hipertensivos devem reduzir a pressão arterial materna sem comprometer o fluxo sanguíneo uteroplacentário, evitando possíveis danos para o feto (MUGO et al., 2005). Em um estudo desenvolvido em gestantes com pré-eclâmpsia que receberam cápsulas de nifedipina 20 mg a cada 8h, por 7 dias *versus* placebo, houve uma redução significativa na pressão arterial das pacientes, bem como nos valores de creatinina plasmática, ureia e proteinúria de 24 horas, sem a redução do fluxo sanguíneo da artéria umbilical (ISMAIL et al., 1993).

De acordo com o trabalho de revisão realizado por Al Khaja et al. (2014), para o tratamento de hipertensão leve a moderada durante a gravidez, a metildopa é universalmente preconizada como droga de primeira escolha. Esse consenso geral deve-se provavelmente ao seu uso extensivo sem qualquer efeito materno adverso.

Nesse mesmo estudo, o labetalol e a nifedipina são descritos como medicamentos de segunda escolha. Kattah e Garovic (2013) demonstraram que a nifedipina é uma alternativa eficaz e segura frente a metildopa como uma droga de primeira escolha para o tratamento de hipertensão na gravidez, pois reduz a pressão arterial materna sem comprometer o fluxo sanguíneo uteroplacentário.

1.2 Diabetes *mellitus*

Os efeitos do diabetes *mellitus* (DM) na farmacocinética e farmacodinâmica de drogas são bem descritos em modelos animais, porém existem poucos dados em humanos (DOSTALEK; AKHLAGHI; PUZANOVOVA, 2012).

O DM representa um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia, que clinicamente provoca poliúria, polifagia, polidipsia e perda da função renal. O DM é classificado em quatro categorias: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e diabetes *mellitus* gestacional (DMG). O DM tipo 1 é caracterizado pela incapacidade de produção da insulina, devido a uma destruição auto-imune ou idiopática das células β pancreáticas. O DM tipo 2, categoria mais prevalente, é causado pela combinação de resistência à insulina com uma deficiência da secreção ou da resposta secretória da insulina. O DMG é caracterizado por intolerância à glicose detectada inicialmente na gravidez e resultante das mesmas anormalidades fisiológicas e genéticas que caracterizam os outros tipos de DM (BUCHANAN; XIANG, 2005; DOSTALEK; AKHLAGHI; PUZANOVOVA, 2012; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Em 2003, a prevalência do diabetes *mellitus* no mundo era de 250 milhões de pessoas. Em 2030, estima-se que haverá 438 milhões de pessoas portadoras de diabetes *mellitus*, incluindo os casos não diagnosticados (aproximadamente 7,5% da população adulta). Esta epidemia afetou tanto os países desenvolvidos, quanto países em desenvolvimento. Mulheres em idade fértil têm desenvolvido cada vez mais diabetes *mellitus* tipo 2 (LAPOLLA; DALFRA; FEDELE, 2008; DOSTALEK; AKHLAGHI; PUZANOVOVA, 2012).

Historicamente, acreditava-se que diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) era uma condição de menor risco comparada a diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) e diabetes *mellitus* gestacional (DMG). Os efeitos do diabetes *mellitus* pré-gestacional, DM1 ou DM2, são mais graves, pois o efeito começa na fertilização e implantação, afetando

a organogênese, o que pode levar a um aborto precoce, defeitos congênitos graves e restrição do crescimento fetal. (TEMPLE; MURPHY, 2010).

Ao contrário do DM1, o DM2 está fortemente associado a obesidade, a qual está associada a um aumento da taxa de mortalidade perinatal, mal formação, parto cesariana, macrossomia e hipertensão arterial (DUNNE, 2005; TEMPLE; MURPHY, 2010).

O volume de distribuição de drogas lipofílicas é afetado pelo DM, porque está relacionado ao grau de obesidade, a qual é o fator mais importante no desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes. O diabetes também provoca mudanças conformacionais na estrutura da albumina, dificultando a ligação de drogas, resultando em um aumento da fração livre (DOSTALEK; AKHLAGHI; PUZANOVOVA, 2012).

O acúmulo de gordura no fígado, devido ao diabetes, leva a uma diminuição do fluxo sanguíneo hepático. Em DM1 há um aumento da atividade enzimática. Em diabéticos com DM2 há uma diminuição da atividade enzimática, inclusive da CYP3A4 (SOTANIEMI et al., 2002; DOSTALEK; AKHLAGHI; PUZANOVOVA, 2012).

A nefropatia diabética causa diferentes efeitos na farmacocinética de drogas, dependendo do tipo de diabetes e do estágio da nefropatia. Diferentes anormalidades na secreção tubular renal, que surgem em diabetes tipo 1 e tipo 2, podem influenciar a farmacocinética de alguns fármacos. No entanto, alterações no *clearance* podem ocorrer independentemente da alteração na função renal. Por exemplo, os fármacos que são altamente ligados às proteínas plasmáticas podem ter um aumento no *clearance* devido à diminuição de ligação às proteínas plasmáticas (PRESTON; EPSTEIN, 1999).

1.3 Farmacocinética durante a gravidez

Durante a gravidez algumas alterações fisiológicas, mais evidentes no terceiro trimestre, ocorrem nos sistemas cardiovascular, renal, gastrointestinal e endócrino, que podem alterar a farmacocinética e a farmacodinâmica de drogas. Devido a essas alterações, os regimes posológicos muitas vezes são modificados para evitar efeitos adversos e ineficácia dos medicamentos (FRISHMAN; ELKAYAM; ARONOW, 2012; GAOHUA et al., 2012).

Pode-se destacar a redução da motilidade intestinal, resultando em um aumento de 30 a 50% no tempo de esvaziamento gástrico e intestinal, devido ao

aumento dos níveis séricos de progesterona. As secreções de muco e ácido gástrico diminuem, levando ao aumento do pH gástrico. Ocorre o aumento do débito cardíaco e o volume plasmático aumenta 50%, consequentemente o volume de distribuição de alguns fármacos é alterado. O número de sítios disponíveis para ligação a proteínas plasmáticas é reduzido, porque são ocupados por esteróides e hormônios placentários, como também diminuição da concentração de albumina. A atividade da CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 e uridina difosfato glucoronosiltransferase (UGT) é aumentada, enquanto a atividade da CYP1A2 e CYP2C19 é diminuída. Um aumento de 25 a 50% no fluxo plasmático renal e um aumento de 50% na taxa de filtração glomerular pode resultar em um aumento na eliminação renal de drogas (ANDERSON, 2005; FRISHMAN; ELKAYAM; ARONOW, 2012).

Os efeitos da gravidez nas concentrações da fração livre e ligada da nifedipina dependem de sua via de administração, dos efeitos relativos da gestação no fluxo sanguíneo hepático, das ligações às proteínas plasmáticas e do *clearance* intrínseco (ANDERSON; CARR, 2009).

A nifedipina sofre extenso metabolismo hepático dependente do CYP3A4. Devido ao aumento significativo da atividade da CYP3A4 na gravidez, há um aumento da extração hepática da mesma, quando administrada por via oral (ANDERSON, 2005; ANDERSON; CARR, 2009). O volume plasmático aumenta cerca de 50% em gestantes, consequentemente, há uma diminuição na concentração de proteína plasmática (FRISHMAN; ELKAYAM; ARONOW, 2012). A diminuição da concentração de albumina sérica leva a aumento da fração de nifedipina não ligada. Em 15 grávidas estudadas durante o terceiro trimestre, o *clearance* da nifedipina foi quatro vezes maior e a meia-vida 50% menor, ao se comparar com controles saudáveis (PREVOST et al., 1992). Em outro estudo, após uma dose oral, houve uma diminuição da concentração máxima (C_{max}), em grávidas, no segundo e terceiro trimestre da gestação (SILBERSCHMIDT et al., 2008).

Para ter, portanto, o mesmo efeito terapêutico da nifedipina nas pacientes não grávidas, uma dosagem maior e um intervalo de tempo menor podem ser necessários (ANDERSON; CARR, 2009).

1.4 Farmacocinética da nifedipina

A nifedipina (dimetil 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4(2-nitrofenil)-3,5-piridina-discarboxilato) (Figura 1) é uma dihidropiridina, antagonista de canal de cálcio e amplamente utilizada no tratamento da angina precordial, hipertensão e outras doenças vasculares. (STONE et al., 1980; ABOU-AUDA et al., 2000; NIOPAS; DAFTSIOS, 2003; GUO et al., 2007; GARBACZ et al., 2009).

A nifedipina é uma droga adequada para o controle da hipertensão na gravidez, devido ao seu modo de ação: ela reduz a resistência vascular sistêmica, aumenta a produção de urina por meio do aumento do fluxo sanguíneo renal e da inibição da liberação da aldosterona (GIANNUBILO et al., 2012).

Devido à natureza lipofílica da nifedipina, os níveis da droga no sangue do cordão umbilical e no leite materno são relativamente altos. Porém a administração oral da nifedipina, não parece representar um grande risco teratogênico (GHANEM; MOVAHED, 2008; GIANNUBILO et al., 2012).

A nifedipina é um composto altamente apolar, fotossensível, absorvido totalmente no trato gastrointestinal, predominantemente a partir do jejuno, mas tem uma biodisponibilidade muito baixa, aproximadamente 45%, quando administrada por via oral, devido ao seu significativo metabolismo pré-sistêmico. Ela é classificada como um medicamento de intermediária a alta extração hepática (FOSTER et al., 1983; WALLER et al., 1984; ABOU-AUDA et al., 2000). Mais que 95% da nifedipina é altamente ligada às proteínas plasmáticas, no entanto a eliminação sistêmica independe da fração ligada às proteínas no plasma, devido a sua eliminação hepática (KLEINBLOESEM et al., 1984).

A eliminação de fármacos de extração hepática é dependente tanto da atividade enzimática quanto do fluxo sanguíneo hepático. Na administração por via oral, o parâmetro farmacocinético área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (AUC) é dependente da atividade enzimática hepática caracterizada pelo *clearance* intrínseco, considerando que outros órgãos não estejam envolvidos na eliminação pré-sistêmica (WILKINSON, 1987; MORGAN; SMALLWOOD, 1990).

Figura 1 – Fórmulas estruturais da nifedipina e de seus metabólitos. Via metabólica da nifedipina sugerida em humanos. M-0, M-I e M-II: maiores metabólitos urinários. (Figura adaptada de BREIMER; SCHELLENS; SOONS, 1989)

Após a absorção, a nifedipina sofre metabolismo, na parede do intestino delgado e no fígado. Ela passa por uma biotransformação oxidativa, principalmente pelo citocromo P-450 (CYP3A4), transformando-se em metabólitos farmacologicamente inativos, mais polares, com meia-via curta, facilmente excretados pelos rins, cerca de 70 a 80% e o restante é excretado nas fezes. Na urina encontra-se apenas traços de nifedipina em sua forma inalterada, cerca de 0,1% (ABOU-AUDA et al., 2000; PAPATSONIS et al., 2001). A via metabólica principal da nifedipina é a aromatização do anel da dihidropiridina, com formação do produto primário desidronifedipina (M-0). A hidrólise subsequente leva ao metabólito M-I, que é excretado na urina em quantidades de 15 a 80% da dose administrada. O M-I pode ser metabolizado, por hidroxilação no grupo metil adjacente (posição 2), no metabólito M-II, que parece ocorrer em 10 a 20% da dose. Em um pH baixo, uma lactona pode ser formada, como está indicado na Figura 1. Uma via alternativa do

metabolismo da nifedipina, pela quebra do éster que precede a aromatização, não está definitivamente estabelecida, apesar de ter sido demonstrada em compostos relacionados, como a nisoldipina, nimodipina e nilvadipina (BREIMER; SCHELLEN; SOONS, 1989; FUNAKI et al., 1989).

Estudos anteriores mostraram que há uma grande variabilidade interindividual na cinética da nifedipina, principalmente em relação às concentrações plasmáticas, que são altamente variáveis (JUON et al, 2008).

Em mulheres grávidas, a meia-vida e o pico de concentração no plasma da nifedipina são menores e o *clearance* é maior ao se comparar com mulheres não grávidas (PAPATSONIS et al., 2001; TSATSARIS; CABROL; CARBONNE, 2004).

1.5 Transferência placentária

A placenta é um órgão complexo constituído por uma superfície de intercâmbio entre a circulação materna e fetal durante a gestação. Sua função é regular as trocas de nutrientes e gases entre a mãe e o feto, bem como remover os resíduos fetais (Figura 2). A barreira placentária protege o conceito contra o efeito de drogas ou de compostos estranhos ao organismo e pode atuar como via transportadora de fármacos para o tratamento fetal (CECKOVA-NOVOTNA; PAVEK; STAUD, 2006; RUBINCHIK-STERN; EYAL, 2012).

A transferência placentária depende das propriedades físico-químicas dos fármacos e das características fisiológicas da unidade mãe-placenta-feto (LITTLE, 1999). O transporte através da placenta envolve o movimento de moléculas entre os três compartimentos: sangue materno, citoplasma do sincitiotrofoblasto e sangue fetal (CAVALLI; BARALDI; CUNHA, 2006).

Muitos mecanismos estão envolvidos na transferência placentária de moléculas endógenas e fármacos, a difusão passiva é o a mais comum, favorecendo o transporte de agentes lipofílicos, como a nifedipina. A placenta também apresenta transportadores de membrana, entre eles, a Glicoproteína-P (P-gp), que é um transportador de efluxo ATP-dependente encontrado na placenta, atuando na redução da exposição de fármacos ao feto (CAMUS et al., 2006).

Figura 2 – Estrutura esquemática da placenta humana. Corte transversal do útero em uma gravidez no termo, mostrando feto ligado à placenta através do cordão umbilical. No esquema detalhado, estrutura de cotilédones, a unidade funcional da placenta é retratada (Figura adaptada de CECKOVA-NOVOTNA; PAVEK; STAUD, 2006).

Considerando que o diabetes *mellitus* tem a capacidade de modificar os sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo de fármacos, incluindo a inibição da CYP3A4 e que a nifedipina é um fármaco eliminado essencialmente por metabolismo dependente do CYP3A4, torna-se relevante o estudo da influência do diabetes *mellitus* tipo 2 na farmacocinética da nifedipina em gestantes hipertensas.

Visto que a gravidez pode induzir e o diabetes inibir a CYP3A4, responsável pelo metabolismo da nifedipina, torna-se pertinente avaliar se existe influência do diabetes *mellitus* tipo 2 sobre o metabolismo da nifedipina, medicamento usado para o tratamento da hipertensão arterial em gestantes.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência do diabetes *mellitus* tipo 2 na farmacocinética da nifedipina em gestantes com hipertensão arterial crônica e investigar a transferência placentária e distribuição para o líquido amniótico.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar o método de análise da nifedipina em plasma, para utilização em estudos farmacocinéticos.
- Desenvolver e validar o método de análise da nifedipina em líquido amniótico, para utilização em estudos farmacocinéticos.
- Avaliar a farmacocinética da nifedipina em plasma, artéria e veia umbilical, espaço intervilo e líquido amniótico de gestantes hipertensas.

4. Pacientes e Métodos

4.1. Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), de acordo com o Processo nº 14421/2012 (ANEXO A). As avaliações foram realizadas apenas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) pelos sujeitos da pesquisa. Foi garantida a liberdade dos sujeitos da pesquisa em recusar a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma.

4.2. Cálculo amostral e seleção de pacientes

O cálculo do tamanho amostral foi obtido através do Teste t de student, empregando os parâmetros farmacocinéticos da nifedipina (WANG et al., 2011) em 20 voluntários masculinos sadios tratados com dose única de 10 mg. Para o cálculo do tamanho amostral o nível de significância foi fixado em 5%, o poder do teste em 80%, a diferença entre as médias de AUC em 40% de 281,2 ng.h/mL (112,5 ng.h/mL) e o desvio padrão dentro do grupo de 99,4 ng.h/mL. Obteve-se um resultado de 10 voluntários por grupo.

Foram investigadas 22 gestantes hipertensas atendidas no Centro Obstétrico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, distribuídas em 02 grupos: 12 gestantes com hipertensão crônica e 10 gestantes portadoras de hipertensão crônica e diabetes *mellitus* tipo 2. As características das pacientes incluídas no estudo estão apresentados na Tabela 1.

Critérios de inclusão: gestantes com hipertensão arterial crônica e gestação única, idade superior a 18 anos, sem intercorrências fetais, em uso de nifedipina retard 20 mg de 12/12 h, e em acompanhamento pré-natal no ambulatório de gestação de alto risco do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Critérios de exclusão: pacientes com nefropatias e hepatopatias crônicas, interrupção da gestação antes da 34ª semana de gestação, gestantes hipertensas que fizerem uso de indutores ou inibidores do CYP.

Critérios de descontinuidade: abandono da medicação, abandono do pré-natal e não aceitação em participar do estudo ou pacientes que se recusarem a assinar o “Termo de consentimento livre e esclarecido”.

4.3. Protocolo clínico

O estudo foi realizado em duas etapas, a etapa 1 nomeada farmacocinética e a etapa 2 nomeada transferência placentária (Figura 3). A primeira etapa foi realizada no terceiro trimestre, a partir da 34ª semana de gestação. As gestantes hipertensas dos dois grupos foram informadas dos detalhes do estudo, assim como possíveis riscos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As pacientes chegaram à Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP/USP em jejum de 12 horas e o café da manhã foi servido 2 horas após a administração de 20 mg de nifedipina (Adalat retard®, Bayer, Brasil, lote BXG28B1).

Uma amostra de 5 mL de sangue materno foi coletada por punção única de veia periférica, para avaliação de função renal e hepática. Uma amostra de 10 mL de sangue materno foi coletada em seringa não heparinizada e transferida para um tubo heparinizado (BD Vacutainer®) para a avaliação da concentração de nifedipina no tempo zero. O acesso venoso foi mantido para coleta de amostras seriadas de 10 mL de sangue materno para a avaliação da concentração de nifedipina nos tempos de 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660 e 720 minutos após a administração do medicamento.

A segunda etapa foi realizada no momento do parto. As pacientes estavam internadas no Centro Obstétrico do HCFMRP/USP e foram coletadas, simultaneamente, amostras de 10 mL de sangue materno (VM), sangue venoso (VU) e arterial (AU) do cordão umbilical, sangue do espaço intervilo (EIV) e uma alíquota de líquido amniótico (LA) para avaliar a transferência placentária e a distribuição da nifedipina nestes compartimentos. A coleta de sangue do cordão umbilical só foi efetuada após o clampeamento e secção do cordão umbilical, não oferecendo riscos para a mãe ou para o neonato.

Figura 3 – Protocolo clínico. TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido; VM: veia materna; VU: veia umbilical; AU: artéria umbilical; EIV: espaço intervilo; LA: líquido amniótico.

As amostras de plasma e líquido amniótico foram armazenadas a 70°C negativos até a análise.

4.4. Métodos

4.4.1. Sistema de coleta do sangue materno, vasos umbilicais, espaço intervilo e líquido amniótico

Foi obtido um acesso venoso periférico com Abocath, mantido por solução fisiológica a 0,9% infundida em volume suficiente até desaparecer o sangue do conduto desse acesso.

Durante cada coleta de sangue, nos tempos pré-determinados pelo protocolo, foram retirados aproximadamente 3 mL de sangue em seringa não heparinizada, sendo este volume desprezado para evitar interferência nas dosagens a serem realizadas. Posteriormente, foram coletados 10 mL de sangue em seringa não heparinizada e armazenados em tubo heparinizado (BD Vacutainer®).

No momento do parto, após a abertura da parede uterina, a bolsa amniótica foi identificada ao se divulsionar o miométrio de forma a permitir a punção amniótica, evitando assim a contaminação do mesmo com material de origem materna. A punção foi realizada após certificar-se que no sítio da punção não havia nenhuma das partes fetais. Além deste cuidado para não lesar o feto, a punção foi realizada com agulha de peridural com ponta romba (estéril), aspirando-se 10 ml de líquido amniótico com seringa. Todos estes procedimentos foram realizados pela equipe médica responsável pela cesárea após treinamento. Após o procedimento as amostras do líquido amniótico foram acondicionadas em caixa térmica e transportadas até o Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), onde foram imediatamente preparadas para acondicionamento a 70°C negativos, para posterior processamento das amostras.

Após o parto foram coletadas amostras do sangue da artéria umbilical, veia umbilical e do espaço intervilo, segundo técnica descrita por Camelo Junior et al. (1995), para determinar as concentrações de nifedipina nestes compartimentos e analisar a taxa de transferência placentária do fármaco.

As amostras de sangue e líquido amniótico coletadas foram centrifugadas a 2000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos, 4°C e coletados os plasmas e

sobrenadante do líquido amniótico de cada amostra. Os plasmas e líquidos amnióticos foram armazenados em tubos criogênicos e congelados sob temperatura de 70°C negativos, até a análise no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para dosagem da concentração plasmática da nifedipina.

4.4.2. Análise bioquímica no soro materno

Foram coletadas amostras de 5 mL de sangue de todas as gestantes do estudo, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório Central de Análises Clínicas do HC-FMRPUSP para análise bioquímica e dosagem sérica de ureia, creatinina, alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubinas (Bb total, Bb direta, Bb indireta), fosfatase alcalina, gama-GT, glicemia, hemoglobina glicada, proteínas totais, albumina, α 1 glicoproteína ácida, colesterol total e frações, triglicérides, sódio (Na⁺) e potássio (K⁺).

4.4.3. Estimativa da função renal

A função de filtração glomerular foi avaliada pelo cálculo do *clearance* de creatinina, estimado pela fórmula proposta por Cockcroft e Gault (1976):

$$CCr = \frac{(140 - \text{idade})(\text{peso})}{72 \times \text{Creatinina}}$$

A idade deve ser calculada em anos, o peso em quilogramas e a creatinina em miligramas por decilitro. Para pacientes do gênero feminino, o valor calculado do *clearance* de creatinina deve ser reduzido em 15%.

4.4.4. Método laboratorial para determinação de nifedipina

4.4.4.1. Soluções padrão e reagentes

Para a análise de plasma e líquido amniótico, foi preparada solução estoque de nifedipina (98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em metanol, grau HPLC, na concentração de 1mg/mL. A partir dessa solução foram realizadas sucessivas diluições em metanol para obtenção das soluções de uso nas concentrações 2; 4; 20; 100; 200; 400; 800; 1200; 2000 ng/mL para análise no plasma. Para análise no líquido amniótico foram preparadas soluções nas concentrações 2; 4; 20; 40; 50; 80; 120; 150; 200 ng/mL.

O fármaco nitrendipina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), foi utilizado como padrão interno. A solução foi preparada na concentração de 1 mg/mL em metanol e posteriormente diluída para 200 ng/mL em metanol.

Os solventes metanol, acetonitrila, pentano (Merck, Darmstadt, Alemanha) e diclorometano (Tedia Company, Fairfield, EUA) foram grau HPLC. O ácido acético glacial e o hidróxido de sódio (Synth, Diadema, Brasil) foram grau P. A. Toda a água utilizada durante o experimento foi obtida em sistema de purificação Milli-Q® Plus (Millipore, Belford, MA, EUA).

A análise foi realizada utilizando vidraria âmbar e sob luz amarela, pois a nifedipina é um fármaco fotossensível.

4.4.4.2. Análise cromatográfica

A análise da nifedipina foi realizada na coluna de fase reversa RP-Select B LiChroCART® (LiChrospher®, Merck, Darmstadt, Alemanha) 125 x 4 mm, com tamanho de partícula de 5 µm e com pré-coluna RP-Select B LiChroCART®, 5µm (LiChrospher®, Merck, Darmstadt, Alemanha), mantida à 24°C. A fase móvel foi constituída por uma mistura de acetonitrila: água (70:30 v/v) adicionada de 0,5% de ácido acético, na vazão de 1,0 mL/min.

O sistema de detecção por espectrometria de massas (MS/MS) utilizado foi o Quattro Micro LC triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com interface de ionização por eletronebulização operando no modo íon positivo. A voltagem do capilar foi de 3 kV. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 120 e 300°C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 450 L/h. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na pressão de aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$ mbar. A voltagem do cone foi mantida em 15 V para a nifedipina e 10 V para o PI. A energia de colisão foi de 10 eV para a nifedipina e PI. As condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão preparadas na fase móvel e introduzidas com bomba de infusão, na vazão de 30 µL/min.

As análises foram executadas no modo MRM (Monitoramento de reações múltiplas). Os íons protonados $[M+H]^+$ e seus respectivos íons produtos foram monitorados nas transições 347>315 m/z para a nifedipina e 361>315 m/z para o PI (nitrendipina). A aquisição e a quantificação de dados foram realizadas utilizando o programa MassLynx versão 3,5 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

4.4.4.3. Preparo de amostras

As amostras de plasma branco foram obtidas pela doação de voluntários sadios no Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP).

As amostras de líquido amniótico branco foram obtidas através de doação de voluntárias sadias no Centro Obstétrico do HCFMRP-USP.

Em tubos de vidro de extração, alíquotas de 500 µL de plasma e líquido amniótico foram enriquecidas com 25 µL da solução de uso do padrão interno (nitrendipina, 50 ng/mL), 100 µL de solução de hidróxido de sódio 1 M, pH 13,0 e extraídas com 5 mL da mistura de pentano:diclorometano (7:3). Os tubos foram vedados e agitados em agitador horizontal de mesa reciprocante (modelo MA 139 / CTF da Marconi) durante 30 minutos a 270 ± 10 ciclos/minuto. Em seguida, foram centrifugados por 10 minutos a 2000 rpm (centrífuga refrigerada Hitachi® modelo CF8DL, Tokyo, Japão). Após a extração, as fases orgânicas foram separadas, transferidas para tubos cônicos de vidro e evaporadas em concentrador de amostras (Christ RCV 2-25 CO plus e Christ CT 04-50 SR). Os resíduos foram reconstituídos em 100 µL da fase móvel, agitados por 10 segundos (agitador de tubos Phoenix modelo AP-56) e 70 µL foram injetados no sistema cromatográfico para a análise.

4.4.5. Validação do método de análise da nifedipina em plasma e líquido amniótico

Os métodos de análise da nifedipina em plasma e líquido amniótico foram validados de acordo com as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012 para métodos bioanalíticos.

4.4.5.1. Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado utilizando-se amostras de líquido amniótico originários de 6 voluntários diferentes e amostras de plasma provenientes de 8 voluntários diferentes, sendo 4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas. Os plasmas e líquidos amnióticos brancos foram processados de acordo com o procedimento de extração descrito no item 4.4.4.3. O padrão interno (PI) e a nifedipina foram acrescentados após o processamento, nas mesmas concentrações das amostras de CQB (Controle de Qualidade de baixa concentração – 0,25 ng/mL de plasma e de

líquido amniótico) e CQA (Controle de Qualidade de alta concentração - 80 ng/mL de plasma e 8 ng/mL de líquido amniótico). Para cada amostra foi calculado o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a fórmula a seguir:

$$\text{FMN} = \frac{(\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz})}{(\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução})}$$

O Coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativo às amostras CQB e CQA deve ser inferior a 15% (quinze por cento).

4.4.5.2. Linearidade

A linearidade de cada método de análise da nifedipina em plasma humano e líquido amniótico foi avaliada através da análise de três curvas analíticas, incluindo a análise da amostra branco (sem analito e padrão interno) e da amostra zero (contendo apenas padrão interno). As curvas foram construídas utilizando alíquotas de 500 µL de plasma branco e 500 µL de líquido amniótico branco enriquecidas com 25 µL de solução padrão de cada solução padrão de uso da nifedipina. As amostras foram extraídas e analisadas como descrito no item 4.4.4.3.

As curvas analíticas foram construídas nas concentrações 0,1; 0,2; 1; 5; 10; 20; 40; 60 e 100 ng/mL de plasma e 0,1; 0,2; 1; 2; 2,5; 4; 6; 7,5 e 10 ng/mL de líquido amniótico.

Para aprovação das curvas analíticas, os padrões de calibração devem apresentar um desvio de até 15% e o limite inferior de quantificação um desvio de até 20%. O coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98.

4.4.5.3. Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas através de estudos intra e intercorridas. As soluções de nifedipina foram preparadas nas concentrações de 0,1 ng/mL (Limite Inferior de Quantificação-LIQ); 0,25 ng/mL (Controle de Qualidade de Baixa Concentração-CQB); 50 ng/mL (Controle de Qualidade de Média Concentração-CQM); 80 ng/mL (Controle de Qualidade de Alta Concentração-CQA) e 160 ng/mL (1:5) (Controle de Qualidade de Diluição-CQD) de plasma. Para o líquido amniótico foram preparadas soluções de nifedipina nas concentrações de 0,1 ng/mL (LIQ), 0,25 ng/mL (CQB), 5 ng/mL (CQM), 8 ng/mL (CQA) e 16 ng/mL (1:5) (CQD). Todas as soluções foram separadas em alíquotas e armazenadas a -70°C até a análise.

Para avaliar a precisão e exatidão intracorrida foram analisadas 5 replicatas destas soluções através de uma única corrida analítica. Na avaliação da precisão e da exatidão intercorridas foram analisadas 5 replicatas de cada uma das soluções de nifedipina durante 3 diferentes corridas.

A avaliação da precisão intra e intercorrida foram realizadas através do cálculo do coeficiente de variação dos resultados obtidos. Para que o método possa ser referido como preciso, o coeficiente de variação deve ser igual ou inferior a 15%, exceto para o LIQ, CV de até 20%. A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de 15% do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de 20% do valor nominal, segundo a fórmula a seguir:

$$\text{EPR} = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal})}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

4.4.5.4. Estabilidade

Foram avaliadas as estabilidades após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, de curta duração e pós-processamento.

Para a avaliação da estabilidade foram preparadas amostras de plasma branco enriquecidas com nifedipina nas concentrações 0,25 ng/mL (CQB) e 80 ng/mL (CQA) de plasma humano e 0,25 ng/mL (CQB) e 8 ng/mL (CQA) de líquido amniótico.

Para verificar a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras enriquecidas foram congeladas a -70°C por 24 h, após esse período, foram descongeladas e congeladas novamente por 24 h, repetindo-se esse processo até o terceiro ciclo de descongelamento quando foram extraídas e analisadas.

Para a avaliação da estabilidade pós-processamento, as amostras extraídas foram mantidas no auto-injetor a 12°C por um período de 12 h, sendo, então injetadas no sistema cromatográfico.

Para a análise da estabilidade de curta duração as amostras enriquecidas foram mantidas em temperatura ambiente (23°C) por 6 h. Após esse período, as amostras foram extraídas e analisadas.

Todos os resultados foram comparados com o valor nominal e foram expressos em porcentagem de desvio e não ultrapassaram 15%.

4.4.6. Análise farmacocinética

A análise farmacocinética da nifedipina foi realizada empregando o programa WinNonlin, versão 4.0 (Pharsight Corp, Mountain View, Calif, EUA). Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática *versus* tempo, avaliadas no estado de equilíbrio, no intervalo de dose de 12h. Esses dados foram avaliados considerando modelo monocompartimental sem *lag time* e cinética de primeira ordem.

A área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo, no estado de equilíbrio (AUC^{0-12}), foi determinada no intervalo de dose de 12h de administração da nifedipina, através do método dos trapezóides. O *clearance* total aparente (Cl_T/F) foi calculado através da equação $Cl_T/F = \text{Dose} / AUC^{0-12}$. O volume de distribuição aparente (V_d/F) foi determinado pela equação padrão do *software* (GABRIELSSON & WEINER, 2000). A concentração plasmática máxima (C_{max}), bem como o tempo para atingir essa concentração (t_{max}) foram determinados diretamente dos valores obtidos das concentrações plasmáticas.

4.4.7. Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do *software* GraphPad Prism® (GraphPad Software, CA, EUA) para obtenção da mediana, percentis 25 e 75%, média, erro padrão da média (EPM) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

O teste Mann-Whitney para dados não pareados foi utilizado para comparar os dados das gestantes hipertensas dos grupos controle e diabético. O nível de significância foi fixado em 5% para todos os testes estatísticos.

5.1. Características das pacientes investigadas

As gestantes investigadas (n=22) foram distribuídas em dois grupos, o grupo controle (n=12), composto por gestantes hipertensas e o grupo DM (n=10), composto por gestantes hipertensas portadoras de diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2).

Os dados demográficos das gestantes investigadas estão apresentados na Tabela 1 como mediana (percentis 25 e 75) e no APÊNDICE B (Tabelas i e ii) como valores individuais. A idade das pacientes variou entre 20 e 40 anos, para o grupo controle e entre 28 e 46 anos, para o grupo DM.

Tabela 1 - Característica das pacientes investigadas. Dados expressos em mediana (Percentis 25 e 75)

Parâmetros	Grupos investigados		p
	Controle (n=12)	DM (n=10)	
	Mediana (Percentis 25-75)	Mediana (Percentis 25-75)	
Idade (anos)	32 (25-36)	37 (33-41)	0,04*
IMC (Kg/m ²)	39,1 (37,3-43,8)	40,9 (35,5-44,7)	0,92
IG durante coleta (semanas)	35,3 (34,9-37,1)	34,8 (34,2-36,2)	0,20
IG no dia do parto (semanas)	39,1 (38,7-39,5)	36,9 (35,2-38,4)	0,02*
Fármacos associados	1,2,3,4	1,2,3,5,6,7,8	

IMC: índice de massa corporal; IG: idade gestacional; **Fármacos associados:** 1: ácido fólico; 2: sulfato ferroso; 3: metildopa; 4: ácido acetilsalicílico; 5: metformina; 6: insulina NPH; 7: insulina regular; 8: betametasona. *Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$. Dados expressos por mediana ().

Todas as gestantes realizaram o pré-natal adequadamente, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP). Os parâmetros bioquímicos estão apresentados na Tabela 2 como mediana (Percentis 25 e 75) e no APÊNDICE C (Tabelas iii e iv) como valores individuais. Os exames laboratoriais para a avaliação da normalidade funcional do sistema hematológico estão apresentados na Tabela 3 como mediana (Percentis 25 e 75) e no APÊNDICE C (Tabelas v e vi) como valores individuais.

Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos das gestantes investigadas. Dados expressos em mediana (Percentis 25 e 75).

Parâmetros Valores de Referência	Grupo investigados		p
	Controle (n=12)	DM (n=10)	
	Mediana (Percentis 25-75)	Mediana (Percentis 25-75)	
Ureia 10-50 mg/dL	13,50 (12,00-16,25)	18,00 (11,50-24,25)	0,37
Creatinina plasmática 0,7-1,5 mg/dL	0,55 (0,50-0,68)	0,62 (0,52-0,66)	0,60
Clearance de creatinina 75-129 mL/min/1,73	241,50 (170,45-301,36)	208,74 (164,57-253,38)	0,45
Bilirrubinas			
Total 0,2-1,2 mg/dL	0,36 (0,29-0,43)	0,32 (0,28-0,42)	0,60
Direta até 0,3 mg/dL	0,11 (0,08-0,15)	0,12 (0,08-0,14)	0,89
Indireta até 0,9 mg/dL	0,24 (0,19-0,31)	0,20 (0,17-0,29)	0,47
ALT até 31U/L	9,00 (6,28-12,8)	16,70 (8,10-21,60)	0,21
AST até 32U/L	12,00 (10,00-15,75)	16,15 (13,45-27,75)	0,08
Albumina 3,5-4,8 g/dL	3,55 (3,45-3,80)	3,60 (3,43-3,78)	0,79
Glicemia 70 -100 mg/dL	82,50 (72,50-88,00)	81,00 (70,50-116,00)	0,84
Hemoglobina glicosilada 4,3-6,5%	5,50 (5,50-5,70)	6,35 (6,13-6,88)	0,002*
Gama-GT 11-50 U/L	30,50 (13,75-35,25)	29,00 (21,00-47,25)	0,28
Alfa 1-glicoproteína ácida 50-120 mg/dL	57,95 (46,7-67,08)	52,89 (45,38-54,75)	0,32
Fosfatase alcalina 65-300 U/L	245,00 (226,75-355,75)	277,00 (214,25-331,00)	0,82
Proteínas totais 6- 8,5 g/dL	6,50 (6,20-6,60)	6,35 (6,10-6,85)	0,89
Colesterol Total < 200mg/dL	226,00 (208,75-259,50)	172,50 (164,75-184,00)	0,008*
HDL > 35 mg/dL	53,50 (46,00-62,50)	47,50 (38,00-48,50)	0,04*
LDL < 130 mg/dL	131,00 (106,25-152,75)	96,00 (77,00-125,50)	0,07
Triglicérides < 150mg/dL	185,00 (140,00-283,00)	147,50 (127,00-181,25)	0,23

*Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$. Dados expressos por mediana (Percentis 25 e 75).

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos das gestantes investigadas. Dados expressos em mediana (Percentis 25 e 75).

Parâmetros Valores de Referência	Grupo investigados		<i>p</i>
	Controle (n=12)	DM (n=10)	
	Mediana (Percentis 25-75)	Mediana (Percentis 25-75)	
Glóbulos vermelhos	4,1	3,9	0,84
3,9 – 5 x 10 ⁶ /μL	(3,8-4,3)	(3,6-4,6)	
Hemoglobina	12,1	11,3	0,28
11,0-15,5 g/dL	(11,8-12,6)	(10,7-12,4)	
Hematócrito	36	35	0,57
35-45%	(35-36)	(32-37)	
Glóbulos brancos	9,5	9,1	0,62
3,5-10,5 x 10 ³ /μL	(6,3-10,4)	(7,5-11,1)	
Neutrófilos	7,3	6,2	0,94
1,7-8,0 x 10 ³ /μL	(4,1-7,7)	(4,8-8,1)	
Linfócitos	1,8	2,0	0,39
0,9-2,9 x 10 ³ /μL	(1,7-2,3)	(1,8-2,5)	
Plaquetas	230	233	1,00
150-450 x 10 ³ /μL	(186-295)	(195-264)	

Teste de Mann-Whitney, *p*>0,05. Dados expressos por mediana (Percentis 25 e 75).

Os exames laboratoriais foram realizados para a avaliação da função hepática (AST, ALT, gama-GT, fosfatase alcalina, bilirrubina total e frações), função renal (ureia, creatinina, *clearance* de creatinina, sódio e potássio), avaliação metabólica (colesterol, triglicérides, HDL, LDL, glicemia de jejum, hemoglobina glicosilada) e hemograma para a avaliação da normalidade do sistema hematológico.

Todas as gestantes apresentaram sorologias negativas para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), da Hepatite B (HBsAg) e Hepatite C (HCV), sífilis (VDRL), toxoplasmose e rubéola. Apresentaram, também, exame parasitológico de fezes e urocultura negativos, bem como exame de Urina I dentro dos parâmetros normais.

Durante as 12 horas de internação na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC), para coleta de amostras seriadas de sangue no estado de equilíbrio do fármaco nifedipina, os parâmetros hemodinâmicos das gestantes foram monitorados através do registro da pressão arterial sistólica e diastólica de 4 em 4 horas (Figura 4). Em relação às pacientes diabéticas, os níveis glicêmicos também foram monitorados, por glicemia capilar, em jejum, às 10h da manhã, 14h e 20h. Todas as pacientes realizaram o exame de cardiotocografia, para monitorar a frequência cardíaca fetal e o tônus uterino. Todos os fetos encontraram-se ativos e reativos. Os valores de glicemia estão apresentados na Tabela 4 como mediana (Percentis 25-75). A pressão arterial e glicemia estão elucidadas por valores individuais no APÊNDICE D (Tabelas vii, viii e ix).

Figura 4 – Gráfico da concentração plasmática e pressão arterial (PA) média *versus* tempo. Dados expressos em média. Cálculo da PA média: $[(PA \text{ SISTÓLICA}) + 2 \times (PA \text{ DIASTÓLICA})]/3$.

O gráfico acima (Figura 4) demonstra a concentração plasmática da nifedipina (em escala logarítmica) em função do tempo comparando com a evolução da pressão arterial média - PAM (mmHg) nos grupos controle e DM. Podemos observar a queda máxima da PAM na avaliação posterior a concentração plasmática máxima e o retorno da mesma e dos valores de PAM no tempo 12h, semelhantes aos valores do tempo zero, certificando a ação da droga no intervalo de dose utilizado.

Tabela 4 – Parâmetros glicêmicos das gestantes do grupo DM durante a coleta seriada de sangue no intervalo de dose da nifedipina. Dados expressos por mediana (Percentis 25-75)

Parâmetros	Grupo DM (n=10)
	Mediana (Percentis 25-75)
Glicemia capilar	88,00
Medida Jejum (mg/dL)	(75,75-119,80)
Glicemia capilar	121,50
Medida 10h (mg/dL)	(92,73-185,30)
Glicemia capilar	123,50
Medida 14h (mg/dL)	(102,50-144,90)
Glicemia capilar	117,00
Medida 20h (mg/dL)	(87,72-158,50)

Dados expressos por mediana (percentis 25-75%).

5.2. Características dos recém-nascidos

Nenhum recém-nascido das pacientes investigadas nos dois grupos apresentou doenças diagnosticadas ao nascer, ou efeitos adversos que pudessem ser atribuídos ao uso da nifedipina durante a gestação. Nenhuma placenta apresentou alteração macroscópica visível. Os valores de peso e altura ao nascer estão apresentados na Tabela 5 como mediana (Percentis 25-75) e no APÊNDICE E (Tabelas x e xi) como valores individuais.

Tabela 5 - Características dos recém-nascidos das pacientes investigadas

Parâmetros	Grupos investigados		p
	Controle (n=12)	DM (n=10)	
	Mediana (Percentis 25-75)	Mediana (Percentis 25-75)	
Peso (g)	3330 (2975-3778)	3010 (2040-3968)	0,41
Estatura (cm)	48,50 (47,13-50,38)	47,25 (43,25-51,75)	0,61
Peso da placenta	610,0 (481,3-692,5)	600,0 (542,5-672,5)	0,77

Teste de Mann-Whitney, $p > 0,05$. Dados expressos por mediana (Percentis 25-75).

5.3. Análise da nifedipina em plasma e líquido amniótico

A análise da nifedipina em plasma humano e líquido amniótico foi realizada por LC-MS/MS.

A Figura 5 apresenta os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produto monitorados nas transições 347>315 para a nifedipina e 361>315 para nitrendipina (PI).

Figura 5 – Espectro de massas do íon molecular protonado (A) e do íon produto (B) da nifedipina e do íon molecular protonado (C) e do íon produto (D) do padrão interno nitrendipina.

A análise da nifedipina foi realizada na coluna de fase reversa RP-Select B com fase móvel constituída por uma mistura de acetonitrila: água (70:30 v/v) adicionada de 0,5% de ácido acético, na vazão de 1,0 mL/min, mantida à 24°C. Os cromatogramas obtidos na análise do plasma e do líquido amniótico estão apresentados na Figura 6.

Figura 6 – Cromatogramas referentes ao tempo de retenção da nifedipina em plasma (I) e líquido amniótico (II). (A) Plasma ou líquido amniótico branco, (B) plasma enriquecido com nifedipina 60 ng/mL ou líquido amniótico enriquecido com nifedipina 6 ng/mL, (C) plasma ou líquido amniótico enriquecidos com o padrão interno nitrendipina 50 ng/mL.

O efeito matriz foi avaliado utilizando-se oito amostras de plasma, dentre essas amostras, quatro eram normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas e seis amostras de líquido amniótico de diferentes doadores nas concentrações 0,25 ng/mL (CQB) e 80 ng/mL (CQA). Os coeficientes de variação do Fator de Matriz

Normalizado (FMN) relativo a todas as amostras analisadas foram inferiores a 15% (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeito matriz para a nifedipina em oito diferentes lotes de plasma humano e seis diferentes lotes de líquido amniótico.

Efeito Matriz			
Concentrações	Plasma	Concentrações	Líquido amniótico
	FMN (CV%)		FMN (CV%)
CQB (0,25 ng/mL)	9,29	CQB (0,25 ng/mL)	5,80
CQA (80 ng/mL)	13,31	CQA (8 ng/mL)	2,49

FMN: Fator da matriz normalizado por PI [(Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz)/(Resposta do analito em solução padrão/Resposta do PI em solução padrão)]; Efeito matriz = FMN Matriz/ FMN solução*100; CV = coeficiente de variação [(SD FMN/ média FMN) x 100].

Os resultados obtidos na validação dos métodos de análise da nifedipina em plasma e líquido amniótico estão demonstrados nas tabelas 7 e 8. Os métodos apresentaram limites de confiança adequados para a aplicação dos mesmos para estudos farmacocinéticos em regime de dose múltipla.

Tabela 7 – Parâmetros de validação do método de análise na nifedipina em plasma humano por LC-MS/MS.

	Nifedipina
<i>Linearidade (0,1-100 ng/mL)</i>	$y=1,2979x+0,0763$
Coeficiente de correlação linear (r)	$r = 0,9956$
<i>Limite de Quantificação (0,1 ng/mL)</i>	
Precisão (CV %, n = 10)	8,84
Exatidão (EPR %, n= 10)	-1,00
<i>Precisão intracorrida (CV %, n=5)</i>	
LIQ (0,1 ng/mL)	8,52
CQB (0,25 ng/mL)	8,08
CQM (50 ng/mL)	4,86
CQA (80 ng/mL)	2,47
CQD 1:5 (160 ng/mL)	4,50
<i>Precisão intercorridas (CV %, n=15)</i>	
LIQ (0,1 ng/mL)	5,90
CQB (0,25 ng/mL)	7,81
CQM (50 ng/mL)	5,15
CQA (80 ng/mL)	2,14
CQD 1:5 (160 ng/mL)	4,09
<i>Exatidão intracorrida (EPR %, n=5)</i>	
LIQ (0,1 ng/mL)	-2,00
CQB (0,25 ng/mL)	7,20
CQM (50 ng/mL)	8,67
CQA (80 ng/mL)	3,03
CQD 1:5 (160 ng/mL)	7,79
<i>Exatidão intercorrida (EPR %, n=15)</i>	
LIQ (0,1 ng/mL)	0,67
CQB (0,25 ng/mL)	5,33
CQM (50 ng/mL)	3,08
CQA (80 ng/mL)	1,57
CQD 1:5 (160 ng/mL)	5,72
<i>Estabilidade (Desvio %, n=3)</i>	
<i>Curta duração (6h a 23°C)</i>	
CQB (0,25 ng/mL)	1,33
CQA (80 ng/mL)	2,25
<i>Pós-processamento (12h a 12°C)</i>	
CQB (0,25 ng/mL)	8,00
CQA (80 ng/mL)	7,67
<i>Três ciclos de congelamento e descongelamento (-70°C)</i>	
CQB (0,25 ng/mL)	-3,20
CQA (80 ng/mL)	0,89
<i>Analito e PI em solução (60 dias a -20°C)</i>	
CQB (0,25ng/mL)	-1,63
CQA (80 ng/mL)	-6,33

CV= Coeficiente de Variação (desvio padrão/concentração média experimental)x100; EPR= Erro Padrão Relativo [(concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal]x100; Desvio: porcentagem de desvio da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

Tabela 8 – Parâmetros de validação do método de análise na nifedipina em líquido amniótico por LC-MS/MS.

	Nifedipina
<i>Linearidade (0,1-10 ng/mL)</i>	$y=1,62167x+0,0546422$
Coeficiente de correlação linear (r)	$r = 0,9953$
<i>Limite de Quantificação (0,1 ng/mL)</i>	
Precisão (CV %, n = 10)	7,99
Exatidão (EPR %, n= 10)	3,00
<i>Precisão intracorrida (CV %, n=5)</i>	
LIQ (0,1 ng/mL)	4,38
CQB (0,25 ng/mL)	2,16
CQM (5 ng/mL)	1,92
CQA (8 ng/mL)	0,74
CQD 1:5 (16 ng/mL)	1,22
<i>Precisão intercorridas (CV %, n=15)</i>	
LIQ (0,1 ng/mL)	4,54
CQB (0,25 ng/mL)	3,83
CQM (5 ng/mL)	2,86
CQA (8 ng/mL)	2,20
CQD 1:5 (16 ng/mL)	2,82
<i>Exatidão intracorrida (EPR %, n=5)</i>	
LIQ (0,1 ng/mL)	2,00
CQB (0,25 ng/mL)	0,80
CQM (5 ng/mL)	0,40
CQA (8 ng/mL)	0,60
CQD 1:5 (16 ng/mL)	0,13
<i>Exatidão intercorrida (EPR %, n=15)</i>	
LIQ (0,1 ng/mL)	0,67
CQB (0,25 ng/mL)	0,67
CQM (5 ng/mL)	1,65
CQA (8 ng/mL)	1,68
CQD 1:5 (16 ng/mL)	0,82
<i>Estabilidade (Desvio %, n=3)</i>	
<i>Curta duração (6h a 23°C)</i>	
CQB (0,25 ng/mL)	1,33
CQA (8 ng/mL)	4,96
<i>Pós-processamento (12h a 12°C)</i>	
CQB (0,25 ng/mL)	-4,00
CQA (8 ng/mL)	1,92
<i>Três ciclos de congelamento e descongelamento (-70°C)</i>	
CQB (0,25 ng/mL)	-2,67
CQA (8 ng/mL)	0,83
<i>Analito e PI em solução (60 dias a -20°C)</i>	
CQB (0,25ng/mL)	1,33
CQA (8 ng/mL)	4,23

CV= Coeficiente de Variação (desvio padrão/concentração média experimental)x100; EPR= Erro Padrão Relativo [(concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal]x100; Desvio: porcentagem de desvio da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

5.4. Farmacocinética na nifedipina em gestantes hipertensas

A farmacocinética da nifedipina foi avaliada em gestantes hipertensas incluídas no grupo controle (n= 12) e no grupo DM (n=10), no intervalo de doses. As curvas médias de concentração plasmática *versus* tempo estão apresentadas na Figura 7. Os parâmetros farmacocinéticos expressos pela mediana, média e intervalo de confiança de 95% estão apresentados na Tabela 9. Os parâmetros farmacocinéticos individuais estão apresentados no APÊNDICE F (Tabelas xii e xiii) e os gráficos individuais de concentração plasmática *versus* tempo para a nifedipina estão apresentados nos APÊNDICES G e H.

Figura 7 - Curvas de concentração plasmática *versus* tempo da nifedipina no estado de equilíbrio obtidas na investigação de gestantes hipertensas do grupo controle (n=12) e do grupo DM (n=10), tratadas com dose múltipla de nifedipina retard, 20 mg/12h. Dados expressos como média e erro padrão da média.

Tabela 9 – Parâmetros farmacocinéticos da nifedipina em gestantes hipertensas do grupo controle e do grupo DM. Os dados estão expressos como mediana, média e intervalo de confiança 95%.

Parâmetros	Grupos investigados		<i>p</i>
	Controle (n=12)	DM (n=10)	
	Mediana Média (IC 95%)	Mediana Média (IC 95%)	
C_{max} (ng/mL)	26,41 28,17 (22,73-33,60)	23,52 26,71 (17,36-36,07)	0,23
t_{max} (h)	1,79 1,61 (1,34-1,87)	1,48 1,48 (1,02-1,94)	0,46
AUC⁰⁻¹² (ng.h/mL)	235,99 250,22 (190,16-310,28)	202,23 232,74 (161,37-304,10)	0,38
Kel (h⁻¹)	0,16 0,16 (0,13-0,18)	0,14 0,23 (0,09-0,37)	0,72
t_{1/2} (h)	4,34 5,09 (3,46-6,71)	5,00 5,19 (3,69-6,69)	0,28
Vd/F (L)	560,96 600,00 (490,89-709,12)	609,40 590,82 (367,24-814,40)	0,87
Cl_T/F (L/h)	84,77 89,17 (70,66-107,67)	98,94 95,99 (75,83-116,16)	0,38

C_{max}: concentração plasmática máxima no estado de equilíbrio; t_{max}: tempo para alcançar C_{max}; AUC⁰⁻¹²: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo; Kel: constante de velocidade de eliminação; t_{1/2}: meia-vida de eliminação; Vd/F: volume de distribuição aparente; Cl_T/F: *clearance* total aparente. Teste de Mann-Whitney para todos os dados pareados, *p*>0,05. Dados expressos por mediana, média (intervalo de confiança 95%).

5.5 Distribuição transplacentária e no líquido amniótico da nifedipina

Na Tabela 10 estão evidenciados os dados da transferência placentária expressos pela razão da concentração de nifedipina da veia umbilical pela veia materna, da artéria umbilical pela veia materna, do espaço intervilo pelo veia materna, da artéria umbilical pela veia umbilical e a distribuição da nifedipina no líquido amniótico, expresso pela razão da concentração do fármaco no líquido amniótico pela veia materna das pacientes dos grupos controle e DM. Os dados foram expressos pela mediana, média e intervalo de confiança de 95%. Os

resultados foram analisados utilizando-se o teste de Mann-Whitney e não foi observada diferença estatisticamente significativa.

Tabela 10 - Transferência placentária da nifedipina e sua distribuição no líquido amniótico de pacientes dos grupos controle e DM. Os dados estão expressos como mediana, média e intervalo de confiança 95%.

Amostras (Razão)	Grupos investigados		p
	Controle (n=12)	DM (n=10)	
	Mediana	Mediana	
	Média (IC 95%)	Média (IC 95%)	
Veia umbilical/Veia Materna	0,53	0,44	0,50
	0,59 (0,35-0,83)	0,47 (0,33-0,61)	
Espaço interviloso/Veia Materna	0,78	0,87	0,97
	0,82 (0,59-1,05)	0,82 (0,65-0,98)	
Artéria umbilical/Veia Umbilical	0,82	0,88	0,67
	0,97 (0,60-1,35)	0,81(0,50-1,14)	
Líquido amniótico/Veia Materna	0,05	0,05	0,79
	0,06 (0,03-0,09)	0,06 (0,02-0,10)*	

*n=8. Teste de Mann-Whitney para todos os dados pareados, $p>0,05$. Dados expressos por mediana, média (intervalo de confiança 95%).

As Figuras 8 e 9 representam as concentrações plasmáticas individuais da nifedipina nas amostras de veia materna, veia e artéria umbilical, espaço interviloso. As Figuras 10 e 11 apresentam as concentrações plasmáticas individuais da veia materna e no líquido amniótico. Todas as amostras foram coletadas no momento do parto das pacientes dos grupos controle e DM.

Figura 8 – Concentrações plasmáticas da nifedipina nos compartimentos materno-fetal em função do tempo para o grupo controle (n=12). Dados individuais.

No gráfico acima (Figura 8) podemos observar as concentrações plasmáticas da nifedipina nos compartimentos materno-fetal em função do tempo para o grupo controle.

Figura 9 - Concentrações plasmáticas da nifedipina nos compartimentos materno-fetal em função do tempo para o grupo DM (n=10). Dados individuais.

No gráfico acima (Figura 9) é possível observar as concentrações plasmática da nifedipina nos compartimento materno-fetal em função do tempo para o grupo DM.

Figura 10 – Concentração plasmática da nifedipina na veia materna e no líquido amniótico em função do tempo para o grupo controle (n=12). Dados individuais.

Na Figura 10 podemos observar a concentração plasmática da nifedipina na veia materna e no líquido amniótico em função do tempo para o grupo controle.

Figura 11 – Concentrações plasmáticas da nifedipina na veia materna e no líquido amniótico em função do tempo para o grupo DM (n=8). Dados individuais.

No gráfico acima (Figura 11) podemos observar a concentração plasmática da nifedipina na veia materna e no líquido amniótico em função do tempo para o grupo DM.

O estudo abrange a investigação da influência do diabetes *mellitus* tipo 2 na farmacocinética e transferência placentária da nifedipina em gestantes hipertensas. Para todas as voluntárias investigadas foi padronizado um regime de dose múltipla de pelo menos 2 semanas. Portanto, foram investigadas na fase de estado de equilíbrio, durante o intervalo de dose de 12 horas de administração de 20 mg de nifedipina retard (Adalat retard®).

As pacientes do grupo DM apresentaram idade materna significativamente maior que as pacientes do grupo controle, entretanto um estudo realizado por Kleinbloesem et al. (1984) mostrou que a idade não influencia a atividade do CYP3A4, responsável pelo metabolismo da nifedipina.

A maioria das pacientes foi considerada obesa com mediana 39,1 e 40,9 kg/m² para os grupos controle e DM, respectivamente. A obesidade pode alterar a farmacocinética de medicamentos, devido à infiltração gordurosa no fígado, provocando alterações nas enzimas do citocromo P450, podendo também alterar o volume de distribuição e o *clearance* de medicamentos (JANSON; THURSKY, 2012; UDY; ROBERTS; LIPMAN, 2013; CLAUS et al., 2013). No entanto, não foram encontradas alterações no efeito anti-hipertensivo da nifedipina relacionados à gordura corporal (STØA-BIRKETVEDT et al. 1995).

Todas as pacientes foram submetidas à avaliação da função metabólica, renal, hepática e hematológica, além da quantificação dos níveis séricos de proteínas totais, alfa 1-glicoproteína ácida e albumina. Os resultados obtidos foram considerados dentro dos valores de normalidade em sua maioria. Foi observada uma elevação da fosfatase alcalina para nove pacientes, a fosfatase alcalina é produzida pelo fígado, intestino, rins e ossos. Durante o período gestacional a placenta também a produz, explicando o aumento desta enzima nas pacientes investigadas (DARBY; CALLAGHAN; MCMAHON, 2011). Os valores do *clearance* da creatinina foram 241,5 e 208,7 mL/min/1,73 para os grupos controle e DM, respectivamente e estão aumentados devido ao aumento da taxa de filtração glomerular de aproximadamente 50% no primeiro trimestre com aumento contínuo durante a gestação (ANDERSON, 2005).

Durante a gravidez ocorre o aumento no volume plasmático e a redução da concentração de albumina, que podem alterar o volume de distribuição dos medicamentos e consequentemente reduzir a concentração plasmática máxima na administração de doses múltiplas ou a concentração inicial na administração da

dose de ataque (ANDERSON, 2005; ABDULJALIL et al., 2012; ISOHERRANEN, 2013). Logo, para a investigação da farmacocinética da nifedipina em gestantes e sua transferência placentária foi necessário o desenvolvimento e a validação de um método analítico em plasma com alta sensibilidade capaz de quantificar o fármaco.

A investigação da distribuição da nifedipina em líquido amniótico requer um método de análise com alta sensibilidade e limite de quantificação compatível com as dose terapêuticas.

Os métodos de análise da nifedipina em plasma e líquido amniótico foram desenvolvidos empregando LC-MS/MS, baseando-se nos trabalhos disponíveis na literatura como o de Lanchote; Ping; Santos (1996); Abou-Auda et al. (2000), Guo et al. (2007), Juon et al. (2008), Wang et al. (2011). O sistema de detecção por espectrometria de massas utilizado foi o Quattro Micro LC triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com interface de ionização por eletronebulização operando no modo íon positivo.

Para o desenvolvimento dos métodos de análise da nifedipina foram necessários 500 µL de plasma e líquido amniótico. As análises consistem de extração líquido-líquido com uma mistura de pentano:diclorometano (7:3) em pH 13,0, seguida pela análise por LC-MS/MS utilizando a coluna de fase reversa RP-Select B LiChroCART® de 125 x 4 mm, partículas de 5 µm e com pré-coluna RP-Select B LiChroCART®, 5µm, mantida à 24°C para separação da nifedipina e do padrão interno nitrendipina. Observamos a separação da nifedipina e do padrão interno com tempo de corrida de 1,61 e 1,85 minutos, respectivamente.

Os dados apresentados indicaram que nenhum dos componentes das matrizes biológicas causou interferências na resposta do fármaco, pois o coeficiente de variação entre todos os fatores de matriz normalizado por padrão interno (FMNs) foi inferior a 15%.

As curvas analíticas construídas para plasma e líquido amniótico, 0,1-100 ng/mL e 0,1-10 ng/mL, respectivamente, mostraram linearidade, com coeficiente de correlação linear superiores a 0,99. Os intervalos lineares abrangem todas as concentrações experimentadas.

O limite de quantificação (LIQ) foi de 0,1 ng/mL para análise em plasma. Este resultado, quando comparado com trabalhos desenvolvidos por Abou-Auda et al. (2000), Niopas e Daftsios (2003), Guo et al. (2007) e Chen et al. (2012), que quantificaram a nifedipina em plasma, mostram que o método desenvolvido no

presente estudo é o de maior sensibilidade. Os autores relataram LIQ variando entre 0,17-5 ng/mL de plasma e utilizaram alíquotas de 500 ou 1000 µL de plasma. O método desenvolvido por Wang et al. (2011) utilizando UPLC-MS/MS (Ultra Performance Liquid Chromatography) observou um LIQ de 0,104 ng/mL em 500 µL de plasma e um tempo de retenção menor, porém é um aparelho com preço maior, aumentando o valor da análise (Tabela 11).

Tabela 11 – Comparação de métodos de análises de nifedipina dos principais trabalhos descritos na literatura comparados com o presente estudo.

Referências	Matriz	Preparação da amostra	Método	LIQ (ng/mL)	Tempo de retenção (min)
Presente estudo	Plasma (0,5 mL)	ELL	LC-MS/MS	0,1	1,61
Abou-Auda (2000)	Plasma (1,0mL)	ELL	HPLC-UV/VIS	3,0	6,60
Niopas e Daftsios (2003)	Plasma (1,0 mL),	EFS	HPLC-UV/VIS	5,0	4,60
Guo et al. (2007)	Plasma (1,0 ML)	ELL	APCI-LC-MS	1,0	3,60
Wang et al. (2011)	Plasma (0,5 mL)	ELL	UPLC-MS/MS	0,104	1,41
Chen et al. (2012)	Plasma (0,5 mL)	ELL	LC-MS/MS	0,17	3,65

LIQ: limite inferior de quantificação; ELL: extração líquido-líquido; EFS: extração em fase sólida; LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; HPLC-UV: high performance liquid chromatographic with ultraviolet/visible detector; APCI-LS-MS: atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatographic-mass spectrometric; UPLC-MS/MS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Em negrito estão os dados do presente estudo.

O LIQ de 0,1 ng/mL de plasma e líquido amniótico permitiu a análise da nifedipina até 12h após a administração de dose múltipla de 20 mg de nifedipina retard para todas as pacientes investigadas e também a análise das amostras coletadas no momento do parto.

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e os erros padrão relativos obtidos nos estudos de exatidão intra e inter-corridas foram

inferiores a 15%, assegurando a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados, podendo assim, ser utilizado como um trabalho de referência para outros estudos que envolvam a análise de nifedipina em plasma e líquido amniótico.

A avaliação da estabilidade em três ciclos de congelamento e descongelamento, manutenção durante 6 h em temperatura ambiente e durante 12 h à 12°C, após o processamento das amostras, apresentou valores de porcentagem de desvio inferiores a 15%, garantindo a estabilidade dos analitos durante o descongelamento, preparo e o processamento das amostras.

A farmacocinética da nifedipina, avaliada com base nos parâmetros C_{max} , t_{max} , AUC^{0-12} , Cl_T/F V_d/F e $t_{1/2}$, não mostra diferenças com significância estatística entre os grupos controle e DM .

De acordo com o estudo realizado por Abou-Auda et al. (2000) os valores de C_{max} , $AUC^{0-\infty}$, t_{max} e $t_{1/2}$ encontrados após administração oral de um comprimido de liberação prolongada, dose única (20 mg) a um paciente saudável foram 61,35 ng/ml, 552,93 ng.h/ml, 1,50 h e 7,74h, respectivamente. No estudo realizado por Wang et al. (2011), após a administração oral de um comprimido de 10 mg de liberação controlada a 20 voluntários sadios, os valores de C_{max} e t_{max} foram $40,6 \pm 8,0$ ng/mL e $3,15 \pm 0,88$ h, respectivamente. A meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) foi de $7,53 \pm 2,10$ h. Os valores de AUC^{0-36} e $AUC^{0-\infty}$ encontrados foram $281,2 \pm 99,4$ ng.h/mL e $293,1 \pm 103,9$ ng.h/mL, respectivamente. No trabalho de Niopas et al. (2003) em que um comprimido de 10 mg foi administrado a 18 voluntários sadios em dose única, os valores encontrados para C_{max} , $AUC^{0-\infty}$, t_{max} e $t_{1/2}$ foram 46,5 ng/mL, 178,2 ng.h/mL, 1,1h e 0,4h, respectivamente (Tabela 12).

O estudo realizado por Prevost et al. (1992) comparou a farmacocinética da nifedipina em gestantes hipertensas e não gestantes. O pico de concentração sérica encontrado após 40 minutos da administração de um comprimido de nifedipina de liberação imediata (10 mg) foi 38,6 ng/mL, a meia-vida de eliminação encontrada foi 1,3h e o *clearance* aparente foi 2,0 L/h/kg para as gestantes. O *clearance* aparente para não gestantes foi 0,49L/h/kg, que demonstrou uma eliminação mais rápida em voluntários sadios, que em gestantes. O pico de concentração sérica foi 73,48 ng/mL e a meia-vida de eliminação foi 3,43h. Esses dados corroboram o nosso estudo e indicam que a meia-vida de eliminação é menor em gestantes, devido ao aumento do *clearance* aparente.

Tabela 12 – Comparação de parâmetros farmacocinéticos de trabalhos da literatura comparados com o presente estudo.

Parâmetros	Grupo controle	Grupo DM	WANG et al., 2011	NIOPAS et al., 2003	ABOU-AUDA et al., 2000
Dose	20 mg	20 mg	10 mg	10 mg	20 mg
Paciente	Gestante	Gestante	Homens sadios	Homens sadios	Homens sadios
Forma farmacêutica	Cp retard	Cp retard	Cp retard	Cp	Cp retard
Quantidade	12/12 h	12/12 h	Dose única	Dose única	Dose única
C _{max} (ng/mL)	28,17	26,71	40,60	46,50	61,35
t _{max} (h)	1,61	1,48	3,15	1,10	1,50
t _{1/2} (h)	5,09	5,19	7,53	2,40	7,74
AUC (ng.h/mL)	250,22*	232,74*	281,20*	178,20**	552,93**
Vd/F (L)	600,00	590,82	-	-	-
Cl _T /F (L/h)	89,17	95,99	-	-	-

- dados não disponíveis. Cp: comprimido. C_{max}: concentração plasmática máxima no estado de equilíbrio; t_{max}: tempo para alcançar C_{max}; t_{1/2}: meia-vida de eliminação; AUC: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo; Vd/F: volume de distribuição aparente; Cl_T/F: *clearance* total aparente. *AUC⁰⁻¹²; **AUC^{0-∞}. Dados expressos por média. Em negrito estão os dados do presente estudo.

No presente estudo, ao se comparar gestantes dos dois grupos com voluntários sadios tratados com diferentes doses de nifedipina pode-se observar uma diminuição do C_{max} comparado a todos os trabalhos e uma diminuição da meia-vida de eliminação, exceto ao se comparar com voluntários sadios tratados com nifedipina de ação imediata. Essa diminuição provavelmente ocorre devido ao aumento do volume de distribuição e do *clearance* nas gestantes. Os dados encontrados na literatura para não gestantes estão comparados com os dados deste estudo na Tabela 12. Little (1999) descreveu que durante a gestação ocorre diminuição da meia-vida de eliminação para a maioria dos fármacos devido ao aumento de distribuição dos mesmos.

Apesar de as pacientes deste estudo estarem em tratamento de múltiplas doses de nifedipina retard 20 mg, o t_{max} das gestantes é comparável ao t_{max} de voluntários sadios tratados com dose única de nifedipina retard 20 mg,

demonstrando que ele não se altera em regime de doses múltiplas e durante a gestação, provavelmente devido a formulação retard do medicamento.

Os parâmetros farmacocinéticos *clearance* (Cl) e volume de distribuição (Vd), dependentes da biodisponibilidade, foram calculados de maneira mais precisa como valores aparentes, ou seja, *clearance* total aparente (Cl_T/F) e volume de distribuição aparente (Vd/F), pois a nifedipina foi administrada somente por via oral às gestantes hipertensas e não há dados da biodisponibilidade da nifedipina na população estudada.

O *clearance* aparente (Cl/F) e o volume de distribuição aparente (Vd/F) são parâmetros farmacocinéticos que dependem da dose de fármaco administrada e da biodisponibilidade. A biodisponibilidade é correspondente a porcentagem do fármaco em sua forma inalterada que atinge a circulação sistêmica. No entanto esse dado não está disponível para a nifedipina administrada via oral em gestantes. Não há estudos de farmacocinética avaliando o Vd aparente da nifedipina em gestantes, nem em adultos saudáveis. Há apenas um estudo (Prevost et al., 1992) que avalia o *clearance* aparente, porém em razão do peso das gestantes, e os resultados demonstraram um aumento do *clearance* nas gestantes ao se comparar com não gestantes.

Os parâmetros Vd/F e Cl/F sofrem alterações devido às alterações fisiológicas da gravidez. O Vd/F pode estar aumentado em até 50% durante a gravidez, devido ao aumento do volume plasmático e a presença do compartimento fetal e seus anexos. A perfusão sanguínea útero-placentária atinge 36 a 42 L/h no termo, sendo 80% destinados a placenta e 20% para o miométrio. O volume corporal aumenta cerca de 8L, em que 60% são distribuídos entre a placenta, feto e líquido amniótico e apenas 40% para os tecidos maternos (LOEBSTEIN et al., 1997; ANDERSON, 2005; FRISHMAN; ELKAYAM; ARONOW, 2012).

A nifedipina é um fármaco de intermediária a alta extração hepática (FOSTER et al., 1983; WALLER et al., 1984) e de acordo com Anderson (2005) durante a gestação há o aumento do fluxo sanguíneo hepático e conseqüentemente ocorre um aumento do *clearance* e diminuição da AUC em fármacos de alta razão de extração hepática. Para tanto, justifica-se a diminuição da AUC nas gestantes hipertensas em relação aos voluntários sadios tratados com dose única de nifedipina retard 20 mg.

O nosso estudo revela resultados exclusivos dos parâmetros farmacocinéticos em gestantes hipertensas e em gestantes hipertensas portadoras de DM2. Ao se

comparar os dois grupos, não encontramos diferença estatisticamente significativa, portanto não há influência do DM2 na farmacocinética da nifedipina em gestantes hipertensas.

As pacientes do grupo DM apresentaram valores de glicemia normais e a maioria das pacientes do grupo DM apresentaram hemoglobina glicada acima do considerado normal, porém apenas uma paciente apresentou valor acima de 8%, considerado DM descompensado (*AMERICAN DIABETES ASSOCIATION*, 2014).

A hiperglicemia é considerada a causa dos danos teciduais do diabetes devido a alterações no metabolismo celular da glicose ou do acúmulo de biomoléculas glicadas e produtos finais da glicação avançada (NEGRE-SALVAYERE et al., 2009). A importância da hiperglicemia na atividade do CYP deve-se ao conteúdo total de CYP, pois a atividade do CYP1A hepático e a atividade do CYP3A hepático correlacionam-se com os níveis de glicose no sangue de ratos com diabetes experimental (BORBÁS et al., 2006). A extensão das complicações do diabetes depende do controle dos níveis glicêmicos e do tempo de diagnóstico (KAWAHITO; KITAHATA; OSHITA, 2009). Estudos em ratos com diabetes experimental tratados com insulina administrada até a obtenção de níveis glicêmicos normais reverte as alterações causadas pelo DM na atividade do citocromo P450 (DONG et al., 1988; YAMAZOE et al., 1989; IBER et al., 2001; GODOY, 2009), sendo que as pacientes do grupo DM estudado faziam uso de insulina, com exceção de uma paciente.

Todos os recém-nascidos das pacientes do grupo controle apresentaram índice Apgar maior que 7 no primeiro e no quinto minuto. Apenas 3% dos recém-nascidos das pacientes do grupo DM apresentaram Apgar menor que 7 no primeiro minuto e apenas 1% apresentou Apgar menor que 7 no quinto minuto. Todos os recém-nascidos apresentaram evolução favorável no período pós-natal.

Fatores placentários e fetais que pudessem interferir na avaliação da taxa de transferência placentária da nifedipina, como o peso da placenta e a idade gestacional foram avaliados. O peso placentário foi homogêneo entre os grupos avaliados e não foram observadas alterações macroscópicas que pudessem alterar o transporte de drogas. A idade gestacional poderia afetar a razão da transferência do fármaco para o feto, já que à medida que a gravidez evolui, a espessura da barreira placentária reduz (VAN DER AA et al., 1998). Entretanto as pacientes de ambos os grupos estavam ao termo e não foi observada diferença estatisticamente

significativa entre a taxa de transferência placentária dos grupos, mostrando atuação não significativa do DM tipo 2 sobre a transferência placentária da nifedipina.

O risco da transferência de fármacos para o feto pode ser direto, dependendo da quantidade de droga transferida pela placenta, ou indireto, alterando a função placentária (VANKY et al., 2005). Poucos são os estudos de transferência placentária da nifedipina.

Não há dados da literatura relativos à transferência placentária da nifedipina usada como anti-hipertensivo em gestantes hipertensas e hipertensas portadoras de DM2. Os dados encontrados são relacionados ao uso da nifedipina como agente tocolítico. Estudos relataram a transferência de 77% de nifedipina de liberação gastrointestinal (30-150mg/dia), 76% em mulheres normotensas preparadas para o parto cesárea (20mg dose única sublingual) e 72% de cápsulas de nifedipina.(20mg 6/6horas) (FERGUSON et al., 1989; WOLFENSBERGER; ZIMMERMANN; VON MANDACH, 2006; SILBERSCHMIDT et al., 2008)

No presente estudo, ao avaliar as razões entre as concentrações de nifedipina nos compartimentos materno e fetal, não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos, demonstrando que o diabetes *mellitus* tipo 2 não influencia a transferência placentária do fármaco. Foi observada a mediana da razão feto/materna (relação entre as concentrações plasmáticas de nifedipina na veia umbilical e no sangue materno periférico) de 0,53 para o grupo controle e 0,44 para o grupo DM, indicando uma baixa transferência placentária desses fármacos através da barreira placentária. Portanto deve-se ser cauteloso ao administrar doses mais altas de nifedipina para que não haja nenhum efeito sobre o feto. Altas concentrações de nifedipina podem causar hipotensão (SMITH; ANTHONY; JOHANSON, 2000). Esses dados estão inferiores aos encontrados na literatura para gestantes que foram tratadas com a nifedipina como agente tocolítico e não há dados referentes a gestantes hipertensas e hipertensas portadoras de DM2.

As razões das concentrações no espaço intervilo/veia materna foram 0,78 para o grupo controle e 0,87 para o grupo DM, observando um equilíbrio entre esses sítios de coleta. Nas Figuras 9 e 10 também é possível observar a proximidade das concentrações na veia materna e no espaço intervilo. Moisés (2008) encontrou em seu estudo uma razão de 1,01 para gestantes normais e 0,88 para gestantes diabéticas ao avaliar a razão de concentrações de lidocaína no espaço

interviloso/veia materna e descreveu que o espaço interviloso é uma região contínua da veia materna, podendo considerá-los como um mesmo compartimento. O espaço interviloso é uma parte histofuncional da placenta originada das lacunas formadas no sinciciotrofoblasto. Os septos placentários dividem o espaço interviloso da placenta em compartimentos que se comunicam livremente e ele é todo preenchido com sangue materno. O sangue fetal mantém contato com o sangue materno presente no espaço interviloso, porém sem contato direto, que assegura as trocas materno-fetais.

A avaliação do metabolismo fetal foi realizada utilizando a razão das concentrações da nifedipina presentes na artéria umbilical e na veia umbilical de 0,82 para o grupo controle e 0,88 para o grupo DM. Essas razões demonstram um baixo metabolismo fetal provavelmente devido a uma relativa imaturidade hepática fetal nesta fase de desenvolvimento, relacionada a uma pequena expressão do CYP3A4 no fígado do feto, responsável pelo metabolismo da nifedipina (STEVENS et al., 2003). Nas figuras 9 e 10 é possível observar concentrações muito próximas da veia e artéria umbilical em ambos os grupos.

A nifedipina foi detectada em todas as amostras de líquido amniótico. As razões líquido amniótico/plasma materno foram 0,05 para ambos os grupos. Considerando que a nifedipina é mais que 95% ligada às proteínas plasmáticas, é possível explicar as baixas concentrações observadas no líquido amniótico (LÖCH et al., 2003).

A composição do líquido amniótico varia com a idade gestacional. No início da gestação, o líquido amniótico é praticamente um ultrafiltrado do plasma materno e ao final da gestação é constituído principalmente por urina fetal. Considerando que o feto engole entre 210 a 760 mL/dia de líquido amniótico, se o líquido apresenta altas concentrações do fármaco, isto poderá representar uma exposição fetal contínua ao fármaco administrado à gestante (LOUGHHEAD et al., 2006). No presente estudo, foram observadas baixas concentrações de nifedipina no líquido amniótico.

Os métodos desenvolvidos e validados para a análise da nifedipina em plasma e líquido amniótico são compatíveis com a aplicação em estudo de farmacocinética em pacientes por apresentarem vantagens como o baixo volume de plasma requerido nas análises (500 µL), corrida cromatográfica de apenas 2 min, simples procedimento de extração líquido-líquido com uma mistura de pentano:diclorometano (7:3), alta sensibilidade com LIQ (0,1 ng/mL de plasma) e

estabilidade assegurada em estudos de curta duração, ciclos de congelamento e descongelamento e pós-processamento. A transferência placentária da nifedipina é relativamente baixa com valores inferiores a 60% e os valores de AUC^{0-12} obtidos estão de acordo com os valores alvos relacionados com eficácia.

1. O diabetes *mellitus* tipo 2 controlado não influencia a farmacocinética da nifedipina em gestantes hipertensas, sugerindo que o regime posológico da nifedipina não precisa ser modificado para gestantes hipertensas portadoras de DM2.
2. O método de análise da nifedipina em plasma e líquido amniótico, empregando LC-MS/MS apresenta limites de quantificação compatíveis com a aplicação em estudos farmacocinéticos e análise até 12 horas após a administração de doses múltiplas de 20 mg do nifedipina/12 h.
3. O diabetes *mellitus* tipo 2 controlado não influencia a transferência placentária da nifedipina em gestantes hipertensas.

8. Referências Bibliográficas

ABDULJALIL, K. et al. Anatomical, physiological and metabolic changes with gestational age during normal pregnancy: a database for parameters required in physiologically based pharmacokinetic modelling. **Clinical Pharmacokinetics**, Auckland, v. 51, n. 6, p. 365-396, 2012.

ABOU-AUDA, H. S. et al. Liquid chromatographic assay of nifedipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 22, n. 2, p. 241–249, 2000.

AL KHAJA, K. A. et al. Drug treatment of hypertension in pregnancy: a critical review of adult guideline recommendations. **Journal of Hypertension**, London, v. 32, n. 3, p. 454-463, 2014.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes - 2014. **Diabetes Care**, New York, v. 37, sup. 1, p.s14-80, 2014.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. Hypertension in pregnancy: Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. **Obstetrics and Gynecologists**, New York, v. 122, n. 5, p. 1122-31, 2013.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 de maio de 2012, seção 1, p. 93.

ANDERSON, G. D. Pregnancy-induced changes in pharmacokinetics: a mechanistic-based approach. **Clinical Pharmacokinetics**, Auckland, v. 44, n. 10, p. 989-1008, 2005.

ANDERSON, G.D.; CARR, D.B. Effect of pregnancy on the pharmacokinetics of antihypertensive drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, Auckland, v. 48, n. 3, p. 159-168, 2009.

BARRA, S. et al. Hypertension in pregnancy: The current state of the art. **Portuguese Journal of Cardiology**, Lisboa, v. 31, n. 6, p. 425-432, 2012.

BATEMAN B. T. et al. Prevalence, trends, and outcomes of chronic hypertension: A nationwide sample of delivery admissions. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 206, n. 2, p. 134 e1-8, 2012.

BETHESDA, M. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy: National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, St. Louis, v. 183, n. 1, p. s1-22, 2000.

BORBÁS, T. et al. Insulin in flavin-containing monooxygenase regulation. Flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450 activities in experimental diabetes.

European Journal of Pharmaceutical Sciences, Amsterdam, v. 28, n. 1-2, p. 51-58, 2006.

BREIMER, D. D.; SCHELLENS, J. H. M.; SOONS, P. A. Nifedipine: variability in its kinetics and metabolism in man. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 445-454, 1989.

BUCHANAN, T.A.; XIANG, A.H. Gestational Diabetes mellitus. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.115, n.3, p.485-491, 2005.

CAMELO JUNIOR, J. S. et al. A new method for sampling maternal blood in the placental intervillous space. **Fetal Diagnosis Therapy**, Basel, v. 10, n. 5, p. 322-325, 1995.

CAMUS, M. et al. Increased expression of MDR1 mRNAs and P-glycoprotein in placentas from HIV-1 infected women. **Placenta**, London, v. 27, n. 6-7, p. 699-706, 2006.

CAVALLI, R. C.; BARALDI, C. O.; CUNHA, S. P. Transferência placentária de drogas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 9, p. 557-564, 2006.

CECKOVA-NOVOTNA, M.; PAVEK, P.; STAUD, F. P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v. 22, n. 3, p.400-410, 2006.

CLAUS, B. O. et al. Augmented renal clearance is a common finding with worse clinical outcome in critically ill patients receiving antimicrobial therapy. **Journal of Critical Care**, Philadelphia, v. 28, n. 5, p. 695–700, 2013.

CHEN, R. et al. A more rapid, sensitive, and specific HPLC-MS/MS method for nifedipine analysis in human plasma and application to a pharmacokinetic study. **Drug Research**, Stuttgart, v. 63, n. 1, p. 38-45, 2013.

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

COPPACK, S.W. et al. Adipose tissue metabolism in obesity: lipase action in vivo before and after a mixed meal. **Metabolism: clinical and experimental**, Philadelphia, v. 41, n. 3, p. 264-272, 1992.

DARBY, R. A. J; CALLAGHAN, R; MCMAHON, R. M. P-glycoprotein inhibition: the past, the present and the future. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 12, n. 8, p. 722-731, 2011.

DONG, Z. G. et al. Mechanism of induction of cytochrome P-450ac (P-450j) in chemically induced and spontaneously diabetic rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New Yourk, v. 263, n. 1, p. 29-35, 1988.

DOSTALEK, M.; AKHLAGHI, F.; PUZANOVOVA, M. Effect of diabetes mellitus on

pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, Auckland, v. 51, n. 8, p. 481-499, 2012.

DUNNE, F. Type 2 diabetes and pregnancy. **Seminar in Fetal & Neonatal Medicine**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 333-339, 2005.

FERGUSON, J. E. II et al. Nifedipine pharmacokinetics during preterm labor tocolysis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 161, n. 6 Pt 1, p. 1485-900, 1989.

FRISHMAN, W. H.; ELKAYAM, U.; ARONOW, W. S. Cardiovascular drugs in pregnancy. **Cardiology Clinics**, Philadelphia, v. 30, n. 3, p. 463-491, 2012.

FUNAKI, T. et. al. In vivo oxidative cleavage of a pyridine-carboxylic acid ester metabolite of nifedipina. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 38, n. 23, p. 4213-4216, 1989.

GAOHUA, L. et al. A pregnancy physiologically-based pharmacokinetic (p-PBPK) model for disposition of drugs metabolized by CYP1A2, CYP3A4 and CYP2D6. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Oxford, v. 74, n. 5, p. 873-885, 2012.

GHANEM, F. A.; MOVAHED, A. Use of antihypertensive drugs during pregnancy and lactation. **Cardiovascular Therapeutics**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 38-49, 2008.

GIANNUBILO, S. R. et al. Nifedipine versus labetalol in the treatment of hypertensive disorders of pregnancy. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, Berlin, v. 286, n. 3, p. 637-642, 2012.

GODOY, A. L. P. C. **Influência do diabetes experimental na disposição cinética e no metabolismo estereosseletivos do *trans*-tramadol em ratos**. 2009. 116 f. Tese (Doutorado em Toxicologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

GUO, Y. et al. Determination of nifedipine in human plasma and its use in bioequivalence study. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 341, n. 1-2, p. 91-96, 2007.

HASLER, W. L. et al. Differences in intragastric pH in diabetic vs. idiopathic gastroparesis: relation to degree of gastric retention. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 294, n. 6, p. G1384-G1391, 2008.

IBER, H. et al. Regulation of hepatic cytochrome P450 2C11 via cAMP: implications for down-regulation in diabetes, fasting, and inflammation. **J Pharmacol Exp Ther**, Baltimore, v. 297, p. 172-180, 2001.

ISMAIL A. A. et al. Evaluation of calcium antagonist (Nifedipine) in the treatment of pre-eclampsia. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, Limerick, v.40, n.1, p.39-43, 1993.

ISOHERRANEN, N.; THUMMEL, K.E. Drug metabolism and transport during pregnancy: How does drug disposition change during pregnancy and what are the mechanisms that cause such changes? **Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals**, Bethesda, v. 41, n. 2, p. 256-262, 2013.

JANSON, B.; THURSKY, K. Dosing of antibiotics in obesity. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 25, n. 6, p. 634–649, 2012.

JUON, A. et al. Nifedipine gastrointestinal therapeutic system (GITS) as an alternative to slow-release for tocolysis: Tolerance and pharmacokinetic profile. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 27-32, 2008.

KARPE, F. et al. Impaired postprandial adipose tissue blood flow response is related to aspects of insulin sensitivity. **Diabetes**, New York, v. 51, n. 8, p. 2467-2473, 2003.

KATTAH, A. G.; GAROVIC, V. D. The management of hypertension in pregnancy. **Advances in Chronic Kidney Disease**, Philadelphia, v. 20, n. 3, p. 229-239, 2013.

KAWAHITO, S.; KITAHATA, H.; OSHITA, S. Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. **World J Gastroenterol**, Beijing, v. 15, p. 4137-4142, 2009.

KINGWELL, B. A. et al. Type 2 diabetic individuals have impaired leg blood flow responses to exercise: role of endothelium-dependent vasodilation. **Diabetes Care**, New York, v. 26, n. 3, p. 899-904, 2003.

KLEINBLOESEM, C. H. et al. Variability in nifedipine pharmacokinetics and dynamics: a new oxidation polymorphism in man. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 33, n. 22, p. 3721-3724, 1984.

LANCHOTE, V. L.; PING, W. C.; SANTOS, S. R. C. J. Influence of renal failure on cytochrome P₄₅₀ activity in hypertensive patients using a “cocktail” of antipyrine and nifedipine. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Berlin, v. 50, n. 1-2, p. 83-89, 1996.

LAPOLLA, A.; DALFRA M. G.; FEDELE, D. Pregnancy complicated by type 2 diabetes: An emerging problem. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 2-7, 2008.

LITTLE, B. B. Pharmacokinetics during pregnancy: evidence – based maternal dose formulation. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 93, n. 5 Pt 2, p. 858-868, 1999.

LÖCH, A. et al. Influence of fetal blood pH when adding amniotic fluid: an in vitro model. **BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Oxford, v. 110, n. 5, p. 453-456, 2003.

LOUGHHEAD, A. M. et al. Placental passage of tricyclic antidepressants. **Biological Psychiatry**, New York, v. 59, n. 3, p. 287-290, 2006.

MOISÉS, E. C. D. **Estudo farmacocinético e análise da distribuição transplacentária da lidocaína e seu metabólito na assistência anestésica via peridural de gestantes diabéticas gestacionais**. 2008. 157 f. Tese (Doutorado em Tocoginecologia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

MORGAN, D. J.; SMALLWOOD, R. A. Clinical significance of pharmacokinetic models of hepatic elimination. **Clinical Pharmacokinetics**, Auckland, v. 18, n. 1, p. 61-76, 1990

MUGO, M. et al. Hypertension in pregnancy. **Current Hypertension Reports**, Philadelphia, v. 7, n. 5, p. 348-354, 2005.

NEGRE-SALVAYERE, A. et al. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. **Antioxid Redox Signal**, New York, v. 11, p. 3071-3109, 2009.

NIOPAS, I.; DAFTSIOS, A. C. Determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography: validation and application to pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 1213-1218, 2003.

PASANEN, M.; PELKONEN, O. Human placental xenobiotic and steroid biotransformations catalyzed by cytochrome P450, epoxide hydrolase, and glutathione S-transferase activities and their relationships to maternal cigarette smoking. **Drug Metabolism Reviews**, London, v. 21, n. 3, p. 427-461, 1990.

PAPATSONIS, D. N. M. et al. Calcium channel blockers in the management of preterm labor and hypertension in pregnancy. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, Limerick, v. 97, n. 2, p. 122-140, 2001.

PRESTON, R. A.; EPSTEIN, M. Effects of Diabetes on Cardiovascular Drug Metabolism: Emerging clinical implications. **Diabetes Care**, New York, v. 22, n. 6, p. 982-988, 1999.

PREVOST, R. R. et al. Oral nifedipine pharmacokinetics in pregnancy-induced hypertension. **Pharmacotherapy**, Malden, v. 12, n. 3, p. 174-177, 1992.

PODYMOW, T.; AUGUST, P. Antihypertensive Drugs in Pregnancy. **Seminars in Nephrology**, Philadelphia, v. 31, n. 1, p. 70-85, 2011.

REGENSTEINER, J. G. et al. Oral L-arginine and vitamins E and C improve endothelial function in women with type 2 diabetes. **Vascular Medicine**, London, v. 8, n. 3, p. 169-175, 2003.

REY, E. et al. Report of Canadian Hypertension Society consensus Conference: 3. Pharmacologic treatment of hypertensive disorders in pregnancy. **CMAJ: Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 157, p. 1245-1254, 1997.

RUBINCHIK-STERN, M.; EYAL, S. Drug interactions at the human placenta: What is the evidence? **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 3, n. 126, p. 1-7, 2012.

SIBAI, B. M. Etiology and management of postpartum hypertension-preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 206, n. 6, p. 470-475, 2012.

SILBERSCHMIDT, A. L. et al. Nifedipine concentration in maternal and umbilical cord blood after nifedipine gastrointestinal therapeutic system for tocolysis. **BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Oxford, v. 115, n. 4, p. 480-485, 2008.

SMITH, P.; ANTHONY, J.; JOHANSON, R. Nifedipine in pregnancy. **BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Oxford, v. 107, n. 3, p. 299-307, 2000.

SOLOMON, C. G.; SEELY, E. W. Hypertension in Pregnancy. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Philadelphia, v. 40, n. 4, p. 847–863, 2011.

SOTANIEMI, E. A. et al. Diabetes and elimination of antipyrine in man: an analysis of 298 patients classified by type of diabetes, age, sex, duration of disease and liver involvement. **Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v. 90, n. 3, p. 155-160, 2002.

STEVENS, J. C. et al. Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 307, n. 2, p. 573-582, 2003.

STØA-BIRKETVEDT, G. et al., Body fat as a predictor of the antihypertensive effect of nifedipine. **Journal of internal medicine**, Oxford, v. 237, n. 2, p. 169-173, 1995

STONE, P. H. et al. Calcium channel blocking agents in the treatment of cardiovascular disorders. Part II: Hemodynamic effects and clinical applications. **Ann Intern Med**, Philadelphia, v. 93, n. 6, p. 886-904, 1980.

TEMPLE, R.; MURPHY H. Type 2 diabetes in pregnancy: An increasing problem. **Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 591-603, 2010.

TRIANAFYLLOU, K. et al. Video-capsule endoscopy gastric and small bowel transit time and completeness of the examination in patients with diabetes mellitus. **Digestive and Liver Disease**, Amsterdam, v. 39, n. 6, p. 575-580, 2007.

TSATSARIS, V.; CABROL, D.; CARBONNE, B. Pharmacokinetics of tocolytic agents. **Clinical Pharmacokinetics**, Auckland, v. 43, n. 13, p. 833-844, 2004.

UDY, A. A.; ROBERTS, J. A.; LIPMAN, J. Clinical implications of antibiotic pharmacokinetic principles in the critically ill. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 39, n. 12, p. 2070–2082, 2013.

VAN DER AA, E. M. et al. Mechanisms of drug transfer across the human placenta. **Pharmacy World & Science: PWS**, Heidelberg, v. 20, n. 4, p. 139-148, 1998.

VANKY, E. et al. Metformin reduces pregnancy complications without affecting androgen levels in pregnant polycystic ovary syndrome women: results of a randomized study. **Human Reproduction**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 1734-1740, 2004.

WALLER, D. G. et al. The first pass metabolism of nifedipine in man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 951-954, 1984.

WANG, D. et al. Determination of nifedipine in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 879, n. 20, p. 1827-1832, 2011.

WILKINSON, G. R. Clearance approaches in pharmacology. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 39, n. 1, p. 1-47, 1987.

WOLFENSBERGER, A.; ZIMMERMANN R.; VON MANDACH, U. Aggressive long-term tocolysis after preterm premature rupture of the membranes and its effects on mortality and morbidity of the newborn. **Fetal Diagnosis and Therapy**, Basel, v. 21, n. 4, p. 366-373, 2006.

YAMAZOE, Y. et al. Cytochrome P450 in livers of diabetic rats: regulation by growth hormone and insulin. **Archives of Biochemistry Biophysics**, New York, v. 268, n. 2, p. 567-575, 1989.

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética e pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 20 de dezembro de 2012

Ofício nº 4565/2012
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 14421/2012

Prezados Senhores,

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 358ª Reunião Ordinária, realizada em 17/12/2012, **aprovou** o adendo, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, versão 3, modificado em 30/11/2012, referente a pesquisa intitulada "INFLUÊNCIA DO DIABETES MELLITUS TIPO 2 NA FARMACOCINÉTICA DA NIFEDIPINA EM GESTANTES HIPERTENSAS".

Atenciosamente,

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

GABRIELA CAMPOS DE OLIVEIRA FILGUEIRA
PROF. DR. RICARDO DE CARVALHO CAVALLI(Orientador)
Depto. de Ginecologia e Obstetrícia

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO - USP**

PESQUISA CIENTÍFICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA VOLUNTÁRIA / IDADE: _____/_____

REGISTRO E/OU DOCUMENTO DE IDENTIFICAÇÃO: _____

NOME DA PESQUISA: **“Influência do diabetes *mellitus* tipo 2 na farmacocinética da nifedipina em gestantes hipertensas.”**

PESQUISADORES:

Aluna:

Gabriela Campos de Oliveira Filgueira – (16) 8141-5953

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli (FMRP-USP) – Cel.: (16) 9148-6221

OBSERVAÇÕES: Projeto Integrado entre a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto–USP e Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto–USP.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convido você a participar do estudo: “Influência do diabetes *mellitus* tipo 2 na farmacocinética da nifedipina em gestantes hipertensas”.

O estudo implica em que você se submeta a procedimentos, exames complementares e tratamentos devidamente planejados, conforme texto a seguir:

Sabe-se que o diabetes *mellitus* tipo 2 pode provocar alterações no organismo capazes de modificar o efeito de medicamentos anti-hipertensivos. Faremos, portanto, uma comparação entre pacientes grávidas hipertensas diabéticas e grávidas hipertensas não diabéticas para verificar se há efeitos diferentes do medicamento anti-hipertensivo denominado nifedipina.

Esta pesquisa terá duração de dois dias e para que a senhora possa participar dela nós iremos coletar, caso concorde, três tubos de sangue de 5 mL cada um (uma colher de sopa) da veia do seu braço para verificar se as funções do seu corpo estão normais. A senhora tomará, via oral, um comprimido de 20 mg de nifedipina retard (Adalat retard®) de 12 em 12 horas. A partir da 34ª semana, se for necessário, a senhora será internada na Unidade de Pesquisa Clínica por 12 horas. Às 8 horas da manhã, a senhora tomará o medicamento nifedipina. Um tubinho plástico será colocado dentro da sua veia, assim você será picada apenas uma vez. E, então serão coletadas amostras de 10 mL de sangue várias vezes (cerca de 18 vezes) com seringa na veia do seu braço, para avaliar a quantidade do medicamento em seu organismo. Na hora do seu parto, nós coletaremos uma amostra de 10 mL do seu sangue, 10 mL do líquido amniótico e depois que seu bebê nascer, será coletada uma amostra de sangue da placenta, tudo isso com os devidos cuidados para evitar contaminação. Nos períodos de 24, 36 e 48 horas após o seu parto, coletaremos três amostras de 10 mL de seu leite e três amostras 10 mL de seu sangue, para verificar qual a quantidade do medicamento presente nos mesmos.

Os riscos da pesquisa são decorrentes da necessidade de punção venosa periférica, podendo causar hematoma ou flebite no local de punção e dor, portanto o procedimento que realizaremos é seguro tanto para a senhora quanto para seu bebê recém-nascido. A sua colaboração levará a benefícios como o melhor entendimento das alterações do medicamento e possibilitará, no futuro, o melhor ajuste de doses para outras gestantes. Permitirá, também, avaliarmos se este medicamento passa para o bebê e ajudará na escolha de medicamentos de riscos mais baixos para a gestante e seus bebês.

Eu, _____, abaixo assinada, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionada com a pesquisa e o tratamento a que serei submetida;

2. A liberdade de aceitar ou não participar da pesquisa, bem como retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação do meu acompanhamento e tratamento no HC-FMRP-USP;

3. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;

4. Os pesquisadores se comprometem a manter sigilo da sua participação e de publicar os resultados da pesquisa para a comunidade médica e científica pertinente;

5. Em caso de danos causados pela pesquisa, a senhora tem o direito de procurar as leis vigentes no Brasil.

Declaro que em ____/____/____ concordei voluntariamente em participar como voluntária do projeto de pesquisa acima referido e que fui devidamente informada de todos os detalhes.

Assinatura da voluntária
RG ou CPF:

Mestranda: Gabriela C. O. Filgueira
CPF: 080.172.456-29

Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli
CPF: 705.704.006-78

Profa Dra Vera Lucia Lanchote
CPF: 033.163.688-33

TESTEMUNHAS NÃO LIGADAS À PESQUISA:

1 _____
Assinatura

Identificação

2 _____
Assinatura

Identificação

OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 201__.

APÊNDICE B – Características individuais das gestantes investigadas

Tabela i – Dados individuais das pacientes do grupo controle (n=12)

Pacientes	Idade (anos)	IMC (kg/m²)	IG durante a coleta (s; d)	IG no dia do parto (s; d)	Medicamentos Associados
1	29	31,17	37s2d	39s	1,2
2	36	38,53	39s4d	39s5d	1,2,3
3	20	21,30	38s	39s6d	2
4	37	38,15	35s1d	38s6d	1,2,4
5	40	42,32	37s2d	38s4d	1,2,3,4
6	36	41,26	35s3d	38s2d	1,2,3
7	24	44,55	34s2d	39s1d	1,2,3
8	34	39,70	35s3d	39s5d	1,2
9	33	52,46	34s5d	38s1d	1,2,4
10	23	37,68	34s3d	40s1d	1,2
11	28	44,31	34s3d	38s4d	1,2
12	31	37,11	36s6d	39s1d	1,2,3

IMC: índice de massa corporal; IG: idade gestacional; s: semanas; d: dias; fármacos associados: 1: ácido fólico; 2: sulfato ferroso; 3: metildopa; 4: ácido acetilsalicílico.

Tabela ii – Dados individuais das pacientes do grupo DM (n=10)

Pacientes	Idade (anos)	IMC (kg/m²)	IG durante a coleta (s; d)	IG no dia do parto (s; d)	Medicamentos Associados
1	42	47,90	34s6d	39s2d	1,2,3,4
2	46	33,25	34s	34	1,2,3,4,5,6,7
3	37	45,46	34s6d	35s4d	1,2,3,4,6
4	33	44,42	36s5d	38s6d	3,4,5
5	40	43,91	34s2d	35s	1,2,4,5,6
6	37	43,67	34s5d	34s5d	1,2,3,4,5
7	28	36,21	38s3d	39s	3
8	32	38,13	34s	34s2d	1,2,3,4,7
9	34	34,35	35s6d	38s1d	4,5
10	40	35,91	34s	39s	1,2,3,4

IMC: índice de massa corporal; IG: idade gestacional; s: semanas; d: dias; fármacos associados: 1: ácido fólico; 2: sulfato ferroso; 3: metformina; 4: insulina NPH; 5: insulina regular; 6: metildopa; 7: betametasona.

APÊNDICE C – Parâmetros bioquímicos e hematológicos utilizados para a avaliação da normalidade dos sistemas/órgãos hematológico, renal, hepático e endócrino.

Tabela iii : Dados individuais dos parâmetros bioquímicos das gestantes do grupo controle (n=12).

Pacientes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ureia (mg/dL)	21,00	19,00	10,00	13,00	12,00	12,00	12,00	14,00	16,00	16,00	13,00	17,00
Creatinina (mg/dL)	0,54	0,71	0,56	0,67	0,44	0,69	0,48	0,50	0,56	0,53	0,43	0,77
Clearance de creatinina	231,63	145,26	163,17	172,87	287,09	217,17	358,77	300,83	302,94	251,36	353,16	160,77
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,51	0,26	0,33	0,33	0,62	0,38	0,40	0,38	0,20	0,31	0,15	0,60
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,07	0,09	0,08	0,10	0,16	0,14	0,13	0,16	0,07	0,11	0,06	0,17
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,44	0,18	0,25	0,24	0,46	0,23	0,27	0,22	0,13	0,19	0,09	0,42
TGO/AST (U/L)	34,70	6,10	12,00	21,00	10,00	23,00	14,00	11,00	13,10	12,00	10,00	9,00
TGP/ALT (U/L)	15,20	6,30	6,20	31,00	7,00	19,00	9,00	9,00	6,00	10,00	12,00	4,00
Albumina (g/dL)	3,60	3,70	3,80	3,50	3,30	3,50	3,80	3,80	3,90	3,50	3,30	3,20
Glicemia (mg/dL)	83,00	73,00	65,00	93,00	77,00	71,00	88,00	94,00	85,00	68,00	88,00	82,00
Hb glicosilada (%)	5,20	5,70	-	5,90	5,20	5,70	5,50	5,50	5,90	5,10	6,10	5,50
Gama-GT (mg/dL)	6,00	30,00	32,00	37,00	36,00	31,00	10,00	7,00	35,00	15,00	68,00	16,00
Alfa1-glicoproteína ácida (mg/dL)	57,90	66,10	47,90	89,00	38,00	39,00	63,00	58,00	43,10	53,00	70,00	92,00
Fosfatase Alcalina (U/L)	220,00	736,00	327,00	499,00	382,00	183,00	235,00	235,00	229,00	347,00	211,00	255,00
Proteínas totais (g/dL)	6,60	6,50	6,60	6,60	5,80	5,90	6,60	5,80	6,60	6,30	6,50	6,50
Colesterol Total (mg/dL)	228,00	250,00	153,00	275,00	214,00	285,00	211,00	178,00	264,00	224,00	202,00	258,00
HDL (mg/dL)	46,00	74,00	42,00	84,00	60,00	46,00	44,00	52,00	53,00	54,00	54,00	70,00
LDL (mg/dL)	120,00	111,00	89,00	182,00	134,00	201,00	141,00	92,00	155,00	128,00	90,00	152,00
Triglicérides (mg/dL)	309,00	324,00	109,00	143,00	102,00	189,00	131,00	172,00	280,00	208,00	292,00	181,00

Tabela iv : Dados individuais dos parâmetros bioquímicos das gestantes do grupo DM (n=10).

Pacientes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ureia (mg/dL)	17,00	30,00	22,00	9,00	35,00	19,00	9,00	25,00	11,00	13,00
Creatinina (mg/dL)	0,38	0,64	0,62	0,50	0,76	0,57	0,47	0,79	0,66	0,62
Clearance de creatinina	368,70	138,37	203,28	343,72	159,61	250,55	254,32	144,04	179,46	214,2
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,31	0,79	0,27	0,34	0,14	0,44	0,31	0,18	0,32	0,51
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,11	0,20	0,07	0,14	0,06	0,13	0,12	0,07	0,16	0,11
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,20	0,60	0,20	0,19	0,08	0,31	0,21	0,12	0,16	0,40
TGO/AST (U/L)	31,00	11,00	34,90	11,00	18,00	17,30	13,20	31,00	15,00	14,20
TGP/ALT (U/L)	31,00	7,00	21,80	6,00	21,00	18,40	8,00	28,10	15,00	8,40
Albumina (g/dL)	3,50	3,70	3,50	3,30	3,10	3,70	3,40	3,80	3,70	3,80
Glicemia (mg/dL)	59,00	149,00	60,00	72,00	110,00	80,00	82,00	70,00	118,00	136,00
Hb glicosilada (%)	6,30	6,90	6,20	5,90	6,80	6,40	5,20	6,10	8,40	7,20
Gama-GT (mg/dL)	49,00	11,00	24,00	33,00	20,00	20,00	42,00	129,00	97,00	25,00
Alfa1-glicoproteína ácida (mg/dL)	54,00	54,00	42,00	63,00	55,00	40,30	44,00	49,50	61,00	51,60
Fosfatase Alcalina (U/L)	269,00	150,00	383,00	304,00	190,00	340,00	204,00	349,00	285,00	245,00
Proteínas totais (g/dL)	6,10	7,10	5,70	6,20	5,70	6,90	6,10	6,70	7,20	6,50
Colesterol Total (mg/dL)	-	140,00	196,00	161,00	170,00	175,00	220,00	180,00	166,00	-
HDL (mg/dL)	-	34,00	48,00	50,00	48,00	39,00	47,00	35,00	52,00	-
LDL (mg/dL)	-	70,00	126,00	81,00	96,00		137,00	125,00	73,00	-
Triglicérides (mg/dL)	-	181,00	112,00	151,00	132,00	102,00	182,00	144,00	203,00	-

- dado não disponível

Tabela v - Dados individuais da avaliação da normalidade funcional do sistema hematológico das gestantes do grupo controle (n=12).

Pacientes	Glóbulos vermelhos (x10 ⁶ /μL)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Glóbulos brancos (x10 ³ /μL)	Neutrófilos (x10 ³ /μL)	Linfócitos (x10 ³ /μL)	Plaquetas (x10 ³ /μL)
1	4,10	12,0	35	10,7	8,0	1,5	220
2	4,29	12,8	38	7,8	6,5	1,1	224
3	3,13	9,2	28	5,0	6,5	1,1	206
4	4,60	12,1	36	6,1	3,6	1,9	295
5	3,92	11,9	36	5,4	2,9	1,8	172
6	3,80	12,0	36	10,1	7,5	1,8	179
7	4,23	12,7	38	6,9	4,1	2,3	295
8	3,73	12,1	35	10,4	7,3	2,4	235
9	3,94	11,3	34	9,9	7,7	1,8	329
10	4,14	11,7	35	9,0	6,6	1,8	147
11	4,43	12,6	36	11,6	7,7	3,2	352
12	4,25	12,5	36	10,2	7,8	1,7	239

Tabela vi - Dados individuais da avaliação da normalidade funcional do sistema hematológico das gestantes do grupo DM (n=10).

Pacientes	Glóbulos vermelhos (x10 ⁶ /μL)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Glóbulos brancos (x10 ³ /μL)	Neutrófilos (x10 ³ /μL)	Linfócitos (x10 ³ /μL)	Plaquetas (x10 ³ /μL)
1	3,59	9,6	29	9,3	6,7	2,0	198
2	3,76	11,2	32	14,2	12,6	1,3	193
3	4,85	10,7	35	6,2	3,0	2,5	224
4	3,56	10,6	32	9,9	7,6	1,9	242
5	4,00	12,5	37	7,8	4,6	2,3	190
6	4,77	13,2	40	7,6	5,1	1,8	246
7	3,60	11,0	33	12,1	9,7	1,8	319
8	4,29	12,2	37	10,8	7,5	3,0	271
9	4,58	12,4	37	8,9	5,6	2,5	262
10	3,77	11,3	34	7,2	4,8	1,7	196

APÊNDICE D – Parâmetros hemodinâmicos e glicêmicos das gestantes investigadas.

Tabela vii - Parâmetros hemodinâmicos individuais das gestantes do grupo controle investigadas durante as 12 horas de internação para coleta seriada de sangue no intervalo de dose da nifedipina (n=12).

Pacientes	Medida 1 (mmHg)	Medida 2 (mmHg)	Medida 3 (mmHg)	Medida 4 (mmHg)
1	159x104	137x95	150x90	155x89
2	143x70	127x79	131x80	155x102
3	157x105	130x80	140x100	120x80
4	130x90	130x80	140x80	130x70
5	141x90	130x90	120x90	135x80
6	152x98	132x69	147x85	151x83
7	132x86	115x66	121x65	117x71
8	130x83	105x60	96x62	143x79
9	126x80	134x82	130x70	136x72
10	148x89	126x73	127x74	132x74
11	144x74	124x65	145x77	140x70
12	136x96	122x77	128x77	133x87

Tabela viii: Parâmetros hemodinâmicos individuais das gestantes do grupo DM investigadas durante as 12 horas de internação para coleta seriada de sangue no intervalo de dose da nifedipina (n=10).

Pacientes	Medida 1 (mmHg)	Medida 2 (mmHg)	Medida 3 (mmHg)	Medida 4 (mmHg)
1	117x76	123x77	110x65	150x90
2			160x100	
3	148x97	141x85	157x90	163x102
4	143x85	118x68	143x77	116x84
5	194x99	176x91	159x84	180x100
6	143x93	132x85	124x84	137x90
7	126x73	118x64	122x69	121x72
8	152x109	146x89	146x87	145x87
9	146x89	132x77	147x90	138x85
10	128x81	127x81	137x87	128x84

Tabela ix - Parâmetros glicêmicos individuais das gestantes do grupo DM investigadas durante as 12 horas de internação para coleta seriada de sangue no intervalo de dose da nifedipina (n=10).

Pacientes	Medida Jejum (mg/dL)	Medida 10h (mg/dL)	Medida 14h (mg/dL)	Medida 20h (mg/dL)
1	59	83	132	151
2	80	279	130	-
3	75	105	98	85
4	85	156	79	98
5	120	162	158	117
6	91	75	103	65
7	71	101	103	83
8	109	85	117	147
9	130	206	176	211
10	158	138	141	151

APÊNDICE E – Características dos recém-nascidos das gestantes investigadas

Tabela x - Características individuais dos recém-nascidos (RN) das pacientes do grupo controle (n=12).

Pacientes	Peso do RN (g)	Estatura (cm)	Peso da placenta (g)	Apgar (1/5 minutos)
1	2930	47,5	500	10/10
2	2540	46,0	400	9/10
3	3110	48,5	475	8/9
4	3190	47,0	630	9/10
5	2820	47,0	445	9/10
6	3855	50,0	710	8/9
7	4180	51,0	640	9/9
8	3530	50,5	540	9/9
9	4260	50,5	880	9/10
10	3510	50,0	740	9/9
11	3350	48,5	620	9/10
12	3310	48,5	600	9/10

Tabela xi - Características individuais dos recém-nascidos (RN) das pacientes do grupo DM (n=10).

Pacientes	Peso do RN (g)	Estatura (cm)	Peso da placenta (g)	Apgar (1/5 minutos)
1	3960	52,0	650	8/8
2	1470	-	300	8/9
3	2240	44,0	545	8/9
4	3410	47,0	740	9/10
5	2135	43,0	535	9/10
6	3780	-	600	5/6
7	2610	47,5	650	6/8
8	1740	42,0	600	6/9
9	4135	51,0	600	8/9
10	3990	52,0	765	9/10

APÊNDICE F – Dados individuais da farmacocinética da nifedipina em gestantes hipertensas tratadas com dose múltipla de nifedipina (Adalat retard®), 20 mg de 12 em 12 horas.

Tabela xii – Dados individuais da farmacocinética da nifedipina em gestantes do grupo controle (n=12).

Pacientes	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (h)	AUC ⁰⁻¹² (ng.h/mL)	Kel (h ⁻¹)	T _{1/2} (h)	CL _{T/F} (L/h)	Vd/F (L)
1	26,25	1,06	206,71	0,15	4,66	96,75	650,63
2	28,64	2,13	239,51	0,16	4,35	83,50	524,61
3	26,05	2,00	194,75	0,20	3,48	102,70	515,18
4	22,13	1,27	145,84	0,19	3,57	137,13	706,21
5	24,60	1,15	472,73	0,06	12,49	42,31	762,62
6	31,69	1,97	243,76	0,18	3,88	82,05	459,82
7	29,27	1,96	232,47	0,18	3,88	86,03	481,83
8	50,90	1,76	386,14	0,18	3,82	51,80	285,26
9	16,64	1,82	141,90	0,16	4,45	140,95	905,26
10	33,97	0,88	258,91	0,15	4,62	77,25	515,63
11	21,26	1,81	271,15	0,09	7,48	73,76	795,67
12	26,57	1,44	208,79	0,16	4,32	95,79	597,32

Tabela xiii - Dados individuais da farmacocinética da nifedipina em gestantes do grupo DM (n=10).

Pacientes	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (h)	AUC ⁰⁻¹² (ng.h/mL)	Kel (h ⁻¹)	T _{1/2} (h)	CL _{T/F} (L/h)	Vd/F (L)
1	16,06	0,79	185,30	0,09	7,43	107,93	1156,60
2	60,95	1,55	487,68	0,16	4,33	41,01	256,15
3	14,41	0,93	206,35	0,07	9,26	96,92	129,49
4	23,24	1,36	186,27	0,14	4,83	107,37	748,18
5	21,97	1,79	215,39	0,13	5,40	92,85	723,66
6	23,80	1,41	242,23	0,12	5,99	82,57	713,76
7	28,58	1,54	141,65	0,28	2,48	141,19	505,05
8	20,96	0,60	162,90	0,14	4,95	122,78	877,12
9	25,75	2,82	198,10	0,32	2,17	100,96	315,47
10	31,39	2,02	301,49	0,14	5,04	66,34	482,70

APÊNDICE G – Curvas individuais de concentração plasmática *versus* tempo para a nifedipina nas gestantes do grupo controle (n=12)

APÊNDICE H - Curvas individuais de concentração plasmática *versus* tempo para a nifedipina nas gestantes do grupo DM (n=10)