UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Disposição cinética e transferência placentária dos enantiômeros
da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento
com antirretrovirais**

Marília Cristina Oliveira Souza

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Disposição cinética e transferência placentária dos enantiômeros
da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento
com antirretrovirais**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia
Orientada: Marília Cristina Oliveira Souza
Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Ribeirão Preto

2015

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.

Souza, Marília Cristina Oliveira

Disposição cinética e transferência placentária dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento com antirretrovirais. Ribeirão Preto, 2015.

65p.: il; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP - Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Lanchote, Vera Lucia.

1. Bupivacaina. 2. Farmacocinética. 3. Parturientes. 4. HIV. 5. Transferência placentária.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marília Cristina Oliveira Souza

Disposição cinética e transferência placentária dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento com antirretrovirais.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do Título de Mestrado em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ao meu pai **Ciro** e minha mãe **Dulce**,
Que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade;
Que, muitas vezes, abriram mão dos seus sonhos para eu que pudesse realizar os meus;
E, além de tudo, me mostraram o verdadeiro amor incondicional.
À minha irmã **Juliana**, pela verdadeira amizade, por estar sempre ao meu lado e por ser meu
maior porto seguro em **Ribeirão Preto**.
A vocês, Papi, Mami e Nana, todo meu amor, carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me fazer acreditar que minha vida está em Seus planos e que eles são maiores e melhores que qualquer sonho que eu possa ter, que me concedeu sabedoria, me iluminou, acompanhou minha jornada e me deu forças para prosseguir.

Aos meus pais, **Ciro e Dulce**, pelo amor incondicional e confiança em todos os momentos da minha vida, por não medirem esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos, por me ensinarem a ser honesta, justa e dedicada, e por serem as melhores pessoas que eu já conheci. Amo vocês incondicionalmente.

À minha querida e amada irmã **Juliana**, pela irmandade, por cuidar de mim, pelo amor, carinho, conselhos, broncas, risadas, sorrisos, abraços, confidências e por ser minha melhor amiga. Você é meu maior e melhor exemplo de inteligência e dedicação. Obrigada por existir!

Ao meu namorado, **Muryllo**, meu grande amor, melhor amigo e companheiro, por sua alegria e entusiasmo, por todos os momentos ao seu lado, pela força nos dias difíceis, paciência, compreensão, sonhos compartilhados, amor e carinho ilimitados. Amor, é com você que eu vivo os melhores dias da minha vida, e é com você que quero viver todos os outros! Obrigada por ser minha melhor metade!

À minha **vovó Jandira**, que mesmo ausente está sempre presente em meus pensamentos. À você, minha fofinha, minha maior lembrança de amor, saudade eterna.

À minha **mainha Rosilene**, por não medir esforços em tornar os momentos especiais e pelo imenso amor.

Aos meus padrinhos, **Geraldinho e Beth**, pelo amor e carinho constantes.

À minha tia **Conceição**, por seu infinito amor e por suas orações.

Às minhas primas, **Luciana**, por ser tão amiga e presente e **Vivian**, pela sua força de viver e alegria contagiante.

À **Fernanda** e ao **Eduardo**, por me acolherem tão bem na família de vocês, por me proporcionarem momentos incríveis e por serem pessoas de tão bom coração, divertidas e especiais em minha vida.

À **Vó Izolina**, por ser tão carinhosa comigo, alegre, me trazer paz e ótimas lembranças da minha vizinha.

Aos meus amigos especiais, **Camila, Luiza, Juliana Vescovi, Fernanda, Daniela, Beatriz, Roberta, Gabriela Campos, Gabriel, Daniel, Diego e João**, por sempre estarem presentes e, de alguma forma, me fazerem mais feliz.

À minha orientadora **Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote** pela dedicação, confiança e pela grande oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa.

Aos amigos e companheiros de laboratório: **Carolina, Daniel, Daniela, Diego, Francine, Gabriela, Giovana, Glauco, João Paulo, Juciene, Leandro, Leonardo, Milena e Natália**, pela troca diária de experiências e conhecimentos, amizade e prontidão em ajudar durante o desenvolvimento deste

trabalho.

Aos **coordenadores clínicos** pela colaboração e disposição em ajudar neste trabalho.

Ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia** (médicos, residentes e equipe de enfermagem) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela contribuição no desenvolvimento do trabalho clínico, na seleção e coleta das amostras das pacientes.

Ao **Corpo Clínico** do Ambulatório de Moléstias Infectocontagiosas em Ginecologia e Obstetrícia (AMIGO) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP pela valiosa contribuição na seleção das pacientes portadoras do HIV.

À equipe do **Centro Obstétrico** do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pelo apoio na coleta das amostras utilizada nesta pesquisa.

À todas pacientes, por aceitar participar da pesquisa e, por muitas vezes, me ensinar uma forma diferente de ver a vida.

À **Dra. Adriana Rocha e Dra. Maria Paula Marques Pereira**, funcionárias do Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP, por todos os ensinamentos, competência e constante auxílio científico.

Ao **Sr. Natalino Bocardo**, funcionário do Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo da FCFRP-USP, por seu auxílio e alegria contagiante, transformando o ambiente de trabalho sempre mais leve e agradável.

À funcionária da Seção de Pós-graduação **Rosemary Ioshimine Gerolineto** por toda dedicação.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

E a todos que não estão presentes nestas linhas mas que, direta ou indiretamente, participaram da minha caminhada desde a graduação até a defesa desta dissertação de mestrado.

À todos vocês meus sinceros agradecimentos!

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de
que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”*

Charlie Chaplin

RESUMO

SOUZA, M. C. O. Disposição cinética e transferência placentária dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento com antirretrovirais, 2015. 65p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A bupivacaína, um anestésico usado na anestesia e analgesia obstétrica, é disponível comercialmente como mistura racêmica dos enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína, os quais apresentam diferença na farmacocinética, eficácia e toxicidade. A bupivacaína é altamente ligada às proteínas plasmáticas, é substrato do transportador de efluxo glicoproteína-P (P-gp) e apresenta eliminação dependente do CYP3A4. Considerando que a infecção pelo HIV aumenta a expressão da P-gp na placenta, enquanto o tratamento com antirretrovirais (ARV) inibe o CYP3A4 e a P-gp, o presente estudo avalia a disposição cinética dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento com antirretrovirais (ARV). No presente estudo, foram investigadas 10 parturientes portadoras do HIV em tratamento com zidovudina, lamivudina, lopinavir e ritonavir. A anestesia ou analgesia foi realizada através da administração de cloridrato de bupivacaína 0,5% com epinefrina 1:200000 em espaço epidural, em doses de 2,5-22,5 mg. As amostras seriadas de sangue foram obtidas nos tempos imediatamente antes, 5, 15, 30, 45 e 60 min e em 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14h após a administração do anestésico bupivacaína. No momento do parto também foram coletadas amostras de sangue materno e sangue do cordão umbilical, para estudos de transferência placentária. Os métodos desenvolvidos e validados para a análise sequencial dos enantiômeros (+)-(R)-bupivacaína e (-)-(S)-bupivacaína como concentração total e como concentração livre em plasma empregando LC-MS/MS são compatíveis com a aplicação em estudo de farmacocinética em parturientes por apresentar as vantagens do baixo volume de plasma (200 µL), corrida cromatográfica de aproximadamente 8 minutos, simples procedimento de extração líquido-líquido, baixo LIQ (0,25 ng de cada enantiômero/mL de plasma como concentração total e 0,125 ng de cada enantiômero/mL de plasma como concentração livre), extensa linearidade (0,25-500 ng de cada enantiômero/mL de plasma como concentração total e 0,125-10 ng de cada enantiômero/mL de plasma como concentração livre) e estabilidade assegurada em estudos de curta duração, ciclos de congelamento e pós-congelamento e pós-processamento. Os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da bupivacaína foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática total *versus* tempo empregando o programa WinNonlin. A farmacocinética da bupivacaína é enantiosseletiva com acúmulo plasmático do enantiômero (S)-(-)-bupivacaína, com razão $AUC_{(R)/(S)}$ igual a 0,91 ($p < 0,05$). A fração livre no plasma (F_u) é maior para o enantiômero (R)-(+)-bupivacaína, 9% (6 – 12), quando comparado ao enantiômero (S)-(-)-bupivacaína, 6 % (4 – 9) ($p < 0,05$). O tratamento com ARV, incluindo o ritonavir, infere interação enantiosseletiva entre os enantiômeros da bupivacaína e a P-gp placentária, com observação de maior inibição para o enantiômero (R)-(+)-bupivacaína.

Palavras-chave: bupivacaína, farmacocinética, parturientes, HIV, transferência placentária.

ABSTRACT

SOUZA, M. C. O. Kinetic disposition and placental transfer of bupivacaine enantiomers in HIV-infected pregnant women in antiretroviral therapy, 2015. 65p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Bupivacaine, an anesthetic used in obstetric anesthesia and analgesia is commercially available as a racemic mixture of (R)-(+)-bupivacaine and (S)-(-)-bupivacaine, which exhibit differences in pharmacokinetics, efficacy and toxicity. Bupivacaine is highly bound to plasma proteins, is a substrate of the efflux transporter P-glycoprotein (P-gp) and presents elimination dependent on CYP3A4. Whereas HIV infection increases the expression of P-gp in the placenta, while treatment with antiretroviral (ARV) inhibits CYP3A4 and P-gp, this study evaluates the kinetic disposition of the enantiomers of bupivacaine in pregnant women with HIV in antiretroviral therapy (ARV). In the present study, we investigated 10 pregnant women with HIV in treatment with zidovudine, lamivudine, lopinavir and ritonavir. Anesthesia or analgesia was performed using 0.5% bupivacaine with epinephrine administration of 1:200,000 in the epidural space, in doses of 2.5 to 22.5 mg. The serial blood samples were taken immediately before the time, 5, 15, 30, 45 and 60 min and 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14h after administration of the anesthetic bupivacaine. At delivery were also collected samples of maternal blood and cord blood, placental transfer studies. The methods developed and validated for sequence analysis of the enantiomers (+)-(R)-bupivacaine and (-)-(S)-bupivacaine and the total concentration as the free plasma concentration using LC-MS/MS spectra are consistent with the application of pharmacokinetic study in pregnant women to present the advantages of low plasma volume (200 μ L), chromatographic run approximately 8 minutes, simple liquid-liquid extraction procedure, low LLQ (0.25 ng each enantiomer/mL of plasma and total concentrations of each enantiomer 0.125 ng/mL as free plasma concentration), extended linearity (0.25 to 500 ng of each enantiomer/mL of plasma and the total concentration of each enantiomer from 0.125 to 10 ng/mL as concentration of plasma free), and ensured stability in short-term studies, cycles of freezing and post-freeze and post-processing. The pharmacokinetic parameters of bupivacaine enantiomers were calculated based on total plasma concentration curves *versus* time using WinNonlin program. Pharmacokinetics of bupivacaine is enantioselective with plasma accumulation of enantiomer (S)-(-)-bupivacaine with AUC ratio (R)/(S) equal to 0.91 ($p < 0.05$). The free fraction in plasma (F_u) is higher for the enantiomer (R)-(+)-bupivacaine, 9% (6-12) enantiomer compared to the (S)-(-)-bupivacaine, 6% (4 - 9) ($p < 0.05$). The ARV treatment, including ritonavir, infers enantioselective interaction between the enantiomers of bupivacaine and P-gp placental, highlighting greater inhibition of the enantiomer (R)-(+)-bupivacaine.

Keywords: bupivacaine, pharmacokinetics, pregnant, HIV, placental transfer.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados clínicos das parturientes portadoras do HIV (n=10)	24
Tabela 2: Características dos recém-nascidos (n=10)	25
Tabela 3: Efeito matriz para os enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína em 8 diferentes lotes de plasma, sendo 4 normais, 2 lipêmicos e 2 hemolisados.....	27
Tabela 4: Parâmetros de validação do método de análise dos enantiômeros (+)-(R)-bupivacaína e (-)-(S)-bupivacaína em plasma.....	28
Tabela 5: Estudo de estabilidade dos enantiômeros (+)-(R)-bupivacaína e (-)-(S)-bupivacaína em plasma.....	29
Tabela 6: Parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros (+)-(R)-bupivacaína e (-)-(S)-bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento com ARV tratadas com cloridrato de bupivacaína racêmica 0,5% viaepidural.....	30
Tabela 7: Concentrações plasmáticas dos enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína em amostras coletadas no momento do parto de parturientes tratadas com dose única via epidural de cloridrato de bupivacaína racêmica.....	32
Tabela 8: Transferência placentária dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV.....	33
Tabela 9: Efeito matriz para os enantiômeros (+)-(R)-bupivacaína e (-)-(S)-bupivacaína em 8 diferentes lotes de ultrafiltrado branco, sendo 4 normais, 2 lipêmicos e 2 hemolisados.....	34
Tabela 10: Parâmetros de validação do método de análise da concentração livre dos enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína no ultrafiltrado.....	35
Tabela 11: Fração livre no plasma (Fu) para os enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (R)-(+)-bupivacaína.....	36
Tabela 12: Parâmetros farmacocinéticos referentes ao presente estudo e ao estudo reportado por Papini <i>et al.</i> ; 2004.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Enantiômeros da bupivacaína.....	10
Figura 2: Estrutura química comum de anestésicos locais.....	10
Figura 3: Gráfico do tamanho da amostra em função do poder do teste no estudo da bupivacaína.....	17
Figura 4: Ultrafiltração do plasma humano.....	22
Figura 5: Espectro de massas do íon protonado (A) e íon produto (B) para os enantiômeros da bupivacaína	25
Figura 6: Espectro de massas do íon protonado (A) e íon produto (B) para a ropivacaína – PI....	26
Figura 7: Cromatogramas referentes à análise de plasma branco. (A) Plasma humano branco, referente à transição dos enantiômeros da bupivacaína; (B) Plasma humano branco, referente à transição da ropivacaína	26
Figura 8: Cromatogramas referentes aos tempos de retenção dos enantiômeros (+)-(R)-bupivacaína e (-)-(S)-bupivacaína, e o PI ropivacaína	27
Figura 9: Curvas concentração plasmática dos enantiômeros da bupivacaína vs tempo em uma parturiente portadora do HIV tratada com 25 mL de cloridrato de bupivacaína racêmica 0,5% via epidural	31
Figura 10: Dispositivo de ultrafiltração Centrifree®	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS: Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
ALT: Alanina Aminotransferase
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARV: Antirretroviral
AST: Aspartato Aminotransferase
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
CQA: Controle de Qualidade de Alta Concentração
CQB: Controle de Qualidade de Baixa Concentração
CDQ: Controle de Qualidade de Diluição
CQM: Controle de Qualidade de Média Concentração
CV: Coeficiente de Variação
CYP: Citocromo P450
EPR: Erro Padrão Relativo
ESI: Eletronebulização
FMN: Fator de Matriz Normalizado
GST: Glutathione-S-Transferase
 γ -GT: Gama Glutamil Transferase
HCFMRP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HDL: Lipoproteína de Alta Densidade
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FCFRP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
IC 95%: Índice confiança 95%
IMC: Índice de massa corporal
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
MRM: Monitoramento de reações múltiplas
MS/MS: Espectrometria de massas
P-gp: Glicoproteína-P
PI: Padrão interno
TGO: Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP: Transaminase Glutâmico Pirúvica
TOTG: Teste Oral de Tolerância a Glicose
UGT: Uridina-Difosfato-Glicuronosil-Transferases
v/v: volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

$AUC^{0-\infty}$: Área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo

Cl : *Clearance* total

Cl/f : *Clearance* total aparente

C_{max} : Concentração plasmática máxima

F_u : Fração livre

$t_{1/2}$: Meia-vida de eliminação

V_d : Volume de distribuição

V_d/f : Volume de distribuição aparente

®: Marca registrada

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS	xiv
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. Introdução	1
1.1 Gravidez	1
1.2 Vírus da imunodeficiência humana	2
1.3 Placenta <i>versus</i> transferência placentária	6
1.5 Bupivacaína	9
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. Casuística e Métodos	16
3.1 Casuística e protocolo clínico	16
3.1.1 Critério de inclusão e exclusão	16
3.1.2 Cálculo do tamanho amostral	16
3.1.3 Procedimento de anestesia loco regional por via epidural e coletas seriadas de sangue.	18
3.2 Métodos	18
3.2.3 Análise dos enantiômeros da bupivacaína em plasma	18
3.2.3.1 Soluções padrão e Reagentes	18
3.2.3.2 Instrumentação	18
3.2.3.3 Preparo da amostra	19
3.2.3.4 Efeito Matriz	19
3.2.4 Validação do método de análise da concentração total dos enantiômeros da bupivacaína em plasma	19
3.2.4.1 Curva de calibração/Linearidade	20
3.2.4.2 Limite Inferior de Quantificação	20
3.2.4.3 Precisão e Exatidão	20
3.2.4.4 Estabilidade	20
3.2.5 Análise da concentração livre dos enantiômeros da bupivacaína em plasma	21
3.2.6 Análise farmacocinética	22
3.2.7 Análise estatística	22
4. Resultados	24
4.1 Características das parturientes investigadas	24
4.2 Características dos recém-nascidos	24
4.3 Validação do método de análise dos enantiômeros da bupivacaína em plasma	25
4.4 Análise farmacocinética dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV	29
4.5 Avaliação da transferência placentária dos enantiômeros da bupivacaína	32
4.3 Validação do método de análise da concentração livre dos enantiômeros da bupivacaína em plasma	33
5. Discussão	38
6. Conclusões	46
7. Referências bibliográficas	48
8. Apêndices	54
9. Anexos	62

Introdução

1. Introdução

1.1 Gravidez

Os regimes de dosagem de medicamentos administrados durante a gestação geralmente são estabelecidos com base em estudos de farmacocinética em homens e em mulheres não grávidas, ignorando o impacto das mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante a gravidez. No entanto, para medicamentos com estreito intervalo terapêutico, o ajuste da dose é necessário em vários estágios da gravidez para evitar ineficácia ou efeitos adversos (GAOHUA et al., 2012).

A gravidez é um estado fisiológico que pode alterar a farmacodinâmica e a farmacocinética, com consequentes modificações nas concentrações plasmáticas e na resposta aos medicamentos em uso na clínica. As alterações na farmacocinética são mais evidentes no terceiro trimestre da gestação (GAOHUA et al., 2012; ABDULJALIL et al., 2012; ISOHERRANEN, 2013).

As alterações fisiológicas relacionadas com modificações na velocidade e na extensão da absorção de fármacos ocorrem devido a redução da secreção gástrica e aumento do pH gástrico, diminuição da motilidade intestinal e ocorrência de náuseas e vômitos. A distribuição dos fármacos também pode ser modificada devido ao aumento da água corporal total, aumento do volume do plasma e da gordura corporal e redução da concentração plasmática de albumina (70-80% dos valores normais no momento do parto), podendo aumentar o volume de distribuição e diminuir a concentração plasmática máxima do fármaco na administração de doses múltiplas ou redução da concentração inicial na administração da dose de ataque (ANDERSON, 2005; GULATI et al., 2009).

O fluxo total hepático aumenta consideravelmente depois de 28 semanas de gestação, resultando em aumento do *clearance* e diminuição da área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (AUC) de fármacos de alta razão de extração hepática, tais como o metoprolol, o midazolam e a morfina, após administração por via não oral. O aumento do *clearance* renal de fármacos também ocorre devido ao aumento significativo da taxa de filtração glomerular, cerca de 50% no primeiro trimestre, juntamente com o fluxo de sangue renal, podendo afetar a concentração plasmática no estado de equilíbrio dos fármacos de excreção renal (ANDERSON, 2005; ISOHERRANEN, 2013).

A atividade das enzimas citocromo P450 (CYP), responsáveis pelo metabolismo de fase I de fármacos, também pode ser alterada com relatos de indução do CYP3A4, CYP2C9 e

CYP2A6 e provavelmente do CYP2D6 e redução da atividade do CYP1A2. Ocorre, também, alteração nas vias de conjugação, dentre elas a Uridina-difosfato-glicuronosil-transferases (UGT) e a N-acetiltransferases (FDA, 2004; ANDERSON, 2005; GULATI et al., 2008; KNOPPERT, 2011; ABDULJALIL et al., 2012; ISOHERRANEN, 2013).

Durante a gravidez, pode ocorrer redução ou aumento na atividade do CYP. Estudos relatam redução na atividade do CYP1A2 com consequente redução do *clearance* total da cafeína em gestantes de 17-32 semanas (ANDERSON, 2005; GAOHUA et al., 2012; TRACY et al., 2005). A atividade do CYP2C19 também é reduzida a partir do final do segundo trimestre da gravidez com acúmulo plasmático de omeprazol, lansoprazol e pantoprazol, entre outros substratos. Por outro lado, a atividade do CYP2C9 é aumentada durante o terceiro trimestre da gestação resultando em redução nas concentrações plasmáticas de seus substratos, tais como a fenitoína (ANDERSON, 2005; ISOHERRANEN, 2013). A atividade do CYP2D6 também parece estar aumentada durante o terceiro trimestre da gestação, inferindo redução de 2 vezes nas concentrações plasmáticas de seus substratos (ABDULJALIL et al., 2012; ANDERSON, 2005; GAOHUA et al., 2012; ISOHERRANEN, 2013; TRACY et al., 2005).

O CYP3A apresenta três principais isoformas, o CYP3A4, CYP3A5 e o CYP3A7. O CYP3A4 é altamente expresso no intestino e no fígado, sendo responsável pelo metabolismo de mais de 70% de todos os fármacos usados na prática clínica, enquanto o CYP3A7 é a enzima mais abundante presente no fígado fetal (MYLLYNEN; PASANEN; VÄHÄKANGAS, 2007; CASARETT et al., 2008; PAL et al., 2012). Destaca-se que um amplo número de interações significativas envolvidas na prática clínica é devido às interações entre fármaco-fármaco, fármaco-plantas medicinais e/ou fitoterápicos e fármaco-alimento, decorrente da inibição ou indução do CYP3A hepático ou intestinal (CASARETT et al., 2008; PAL et al., 2012). Os estudos com substratos do CYP3A sugerem aumento da atividade da enzima em 35-38% durante a gestação. No entanto, em função da alta variabilidade interindividual na atividade da enzima e do número limitado de pacientes até então investigadas, os dados ainda não são claros em termos das necessidades ou não do ajuste do regime de dosagem de substratos do CYP3A (ABDULJALIL et al., 2012; ANDERSON, 2005; TRACY et al., 2005).

A atividade de outras enzimas, tais como a UGT1A1, UGT1A4 e UGT2B7, também é aumentada durante a gestação (ANDERSON, 2005; ISOHERRANEN, 2013).

1.2 Vírus da imunodeficiência humana

Segundo o último Boletim Epidemiológico Aids e DST do Ministério da Saúde (2013), o Brasil apresenta 709.477 casos registrados de infecção pelo HIV de 1980 até junho de 2013, dos quais 445.197 (64,9%) são do sexo masculino e 241.223 (35,1%) do sexo feminino. Do total de casos registrados, 379.045 (55,2%) são da região sudeste, 137.126 (20,0%) da região sul, 95.516 (13,9%) da região nordeste, 39.691 (5,8%) da região centro-oeste e 35.100 (5,1%) da região norte.

O número de casos de infecção pelo HIV em gestantes de 2000 a Junho de 2013 é de 77.066, compreendido em sua maioria na faixa etária de 20 a 29 anos de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é descrita como uma doença caracterizada por sinais e sintomas provocados pela debilitação do sistema imunológico, devido à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). O vírus apresenta núcleo proteico com cópias de RNA constituindo o seu genoma e enzimas virais, como a transcriptase reversa, integrase e protease. Ele é envolto por um envelope lipoproteico, no qual se inserem as proteínas gp120 e gp41 (GROTTO AND PARDINI, 2006).

O HIV é classificado como um RNA vírus pertencente à família *Lentiviridae* e ao grupo dos retrovírus. O vírus é dividido em dois grupos HIV-1 e HIV-2, sendo o HIV-1 subdividido em grupos M, O e N. O grupo M ainda se subdivide em A, B, C, D, E, F, G, H e J, mostrando grande diversidade genética viral. A variabilidade descrita é resultado do processo de recombinação genética entre diferentes vírus. A co-circulação dos múltiplos subtipos virais promove o surgimento de co-infecção, conduzindo ao aparecimento de vírus recombinantes (GROTTO AND PARDINI, 2006; KILLIAN AND LEVY, 2011; KLASSE, 2012).

Como todos os outros vírus, o HIV deve ser introduzido em uma célula susceptível a fim de se replicar. O bloqueio da replicação é de grande interesse médico, devido ao surgimento de novos casos. Relata-se que cerca de 2 a 3 milhões de pessoas se tornam infectadas pelo HIV a cada ano e que a transmissão é geralmente sexual. Vírus no sêmen ou nos fluidos corporais encontram células susceptíveis, como linfócitos T (T_{CD4+}) e células dendríticas, dentro do epitélio genital ou através de fendas no revestimento mucoso (KILLIAN AND LEVY, 2011; KLASSE, 2012).

A infecção de uma célula-alvo susceptível ao HIV começa com a adesão do vírus ao receptor $CD4+$ da célula-alvo. O $CD4+$ está presente na superfície de muitos linfócitos, que são uma parte essencial do sistema imunológico do organismo. Evidências recentes indicam

que o HIV precisa de um co-receptor para entrar na célula. No envelope de glicoproteína do HIV há a presença de um precursor, o gp160, que medeia a fusão do vírus com a membrana da célula. Esse precursor é clivado por uma protease em uma subunidade externa, gp41, e uma transmembrana, a gp120 (proteína com cinco regiões constantes e três variáveis) (GROTTO AND PARDINI, 2006; KLASSE, 2012).

O material genético do vírus (RNA) é liberado, passa pelo processo de transcrição reversa e se converte em DNA. Uma enzima do HIV chamada transcriptase reversa é necessária para catalisar esta conversão do RNA viral em DNA. Fármacos utilizados na terapia apresentam como alvo enzimas virais (transcriptase reversa, integrase e protease), e os passos de ligação de células necessárias para a replicação do HIV e de entrada. Inibidores da transcriptase reversa, como o AZT, foram os primeiros medicamentos anti-HIV e continuam sendo essenciais no tratamento de pacientes portadores do HIV. Os inibidores da transcriptase reversa se dividem em duas classes com base na sua estrutura e na maneira como eles inibem a transcriptase reversa, os análogos de nucleosídeo, que atuam por meio de mecanismos competitivos na finalização da cadeia de DNA, bloqueando a sua síntese, e não análogos de nucleosídeos, que induzem modificações estruturais nos sítios ativos enzimáticos. A atividade de reparo é ausente, não corrigindo possíveis erros que ocorrem na síntese de DNA e, consequentemente, ocasionando altas taxas de mutação (GROTTO AND PARDINI, 2006; KILLIAN AND LEVY, 2011; KLASSE, 2012).

Uma vez que o material genético do HIV foi convertido em DNA, este DNA viral entra no núcleo, onde se integra ao material genético da célula. A enzima integrase catalisa este processo e os inibidores da integrase estão sob estudo como um novo caminho para o bloqueio da replicação do HIV. Depois de integrado ao material genético do hospedeiro, o HIV pode permanecer em estado latente por muitos anos. Esta habilidade que o HIV tem de se abrigar e de permanecer latente em células infectadas é o maior obstáculo para a erradicação ou a cura do HIV. Por esta razão, com base no conhecimento atual, os pacientes devem se manter em terapia antirretroviral por toda a vida (KLASSE, 2012). A latência viral ocorre devido a presença de fatores de resistência intracelulares no hospedeiro, ligados a imunidade, que impedem a replicação viral, como o IFN tipo 1 e outras proteínas intracelulares. Outra barreira intracelular para a replicação do HIV é a autofagia, principal via de degradação de proteínas de vida longa e reciclagem de nutrientes citoplasmáticos (KILLIAN AND LEVY, 2011).

A ativação da célula-alvo resulta na transcrição do DNA viral em RNA mensageiro (mRNA), que é então traduzido em proteínas virais. O novo RNA viral forma o material

genético da próxima geração de vírus. O RNA viral e as proteínas virais se estruturam junto à membrana da célula para formar um novo vírus. Uma das proteínas do HIV é a protease, que é necessária no processamento de outras proteínas do HIV que, desse modo, adquirem sua forma funcional. Os inibidores de protease são um dos mais potentes tipos de medicamento antiviral e atuam bloqueando este estágio crítico da maturação do vírus. Dessa forma, geralmente combina-se um análogo de nucleosídeo do HIV e pelo menos um inibidor de protease. Após a estruturação na superfície da célula, o vírus se desprende desta e fica livre para infectar outra célula-alvo. Se o ciclo de vida do HIV não for interrompido através do tratamento, a infecção por este vírus se espalha pelo corpo e resulta na destruição do sistema imunológico do organismo (KLASSE, 2012).

É importante ressaltar que o lopinavir e o ritonavir, ambos inibidores de proteases e fármacos de escolha no tratamento do HIV, apresentam alta ligação às proteínas plasmáticas, sendo 98 - 99% ligados à albumina e à alfa-1-glicoproteína ácida. Estas proteínas plasmáticas possuem um importante impacto na transferência placentária de medicamentos, sendo que suas concentrações podem apresentar diferenças interindividuais e sofrer modificações durante a infecção pelo HIV e/ou na gestação (GAVARD, *et al.*, 2006).

Os pacientes portadores do HIV em tratamento com inibidores de proteases e nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa exibem modificações nas composições corporais em relação ao perfil lipídico, incluindo atrofia da gordura periférica e lipohipertrofia visceral, homeostase da glicose e saúde cardiovascular. Os indivíduos infectados apresentam alta prevalência de dislipidemias, resistência à insulina e diabetes, e maior risco cardiovascular, comparado com os pacientes não infectados (CALZA *et al.*, 2004; STANLEY AND GRINSPOON, 2012).

O risco para o desenvolvimento de diabetes em pacientes portadores de HIV e não tratados com antirretrovirais é igual ou moderadamente maior que o da população em geral. No entanto, em pacientes em tratamento com antirretrovirais observa-se aumento na ocorrência de diabetes mellitus tipo 2. Os mecanismos envolvidos na alteração da homeostase da glicose pelos antirretrovirais incluem o bloqueio do transportador de glicose GLUT4 e modificação da sensibilidade das células β , pelos inibidores de protease, e resistência à insulina pelos nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa (STANLEY AND GRINSPOON, 2012).

Os pacientes infectados pelo HIV exibem dislipidemias com diminuição dos níveis de HDL (lipoproteína de alta densidade) e aumento dos níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade). As complicações clínicas associadas com a terapia antirretroviral altamente ativa

e alterações nos valores de lipídio no plasma abdominal incluem eventos cardiovasculares prematuros, como infarto do miocárdio e doença na artéria coronariana. O aumento nos níveis de triglicérides está associado com um aumento de 17% do risco de infarto agudo do miocárdio (CALZA *et al.*, 2004; STANLEY AND GRINSPOON, 2012).

Os objetivos do uso de antirretrovirais (ARV) na gravidez incluem tanto o tratamento da infecção da mãe quanto a prevenção da transmissão vertical (TV), a qual pode ocorrer no útero, durante o parto ou na amamentação. Entre o ano 2000, quando a profilaxia com ARV foi introduzida nos países desenvolvidos, e o ano 2009, foram registrados 269000 novos casos de crianças infectadas, representando uma redução de 24% no número anual de novos casos de crianças infectadas (MAHY *et al.*, 2010). A replicação do vírus em crianças ocorre de forma mais rápida, devido a maior carga viral comparada com adultos e a progressão da doença ser mais acelerada. Dessa forma, a TV é considerada uma das maiores causas de morbidade e mortalidade infantil (GULATI *et al.*, 2009).

Nos países em que a amamentação é comum, a probabilidade de TV, quando a mãe não está realizando o tratamento com antirretrovirais é de 20 a 45%, sendo de aproximadamente 15 a 25% durante a gravidez, e de 5 a 20% de transmissão durante a amamentação. Em países desenvolvidos, os ARVs são mais eficazes e fornecidos para as mulheres grávidas HIV-positivas e com a amamentação limitada, o nível de transmissão vertical diminui para menos de 2% (MAHY *et al.*, 2010; NEWELL AND BUNDERS, 2013). Dessa forma, a terapia antirretroviral promove a supressão da carga viral do HIV, restaura a função imune, previne a transmissão do HIV e melhora a qualidade de vida (MARGOLIS *et al.*, 2014).

1.3 Placenta *versus* transferência placentária

A placenta é um órgão que forma a interface entre a circulação materna e fetal durante a gestação, com função de regular a troca de nutrientes e gases entre a mãe e o feto, suporte para produção de hormônios na gravidez e, também remover os resíduos fetais. É formada por tecido fetal (membrana coriônica e vilosidades coriônicas) e por tecido materno (decídua basal). A decídua apresenta septos que dividem o órgão em 20 a 40 compartimentos, denominados de cotilédones, os quais representam as unidades vasculares funcionais da placenta. Cada cotilédone é formado pelo endotélio capilar fetal, estroma das vilosidades e uma camada de trofoblasto, sendo banhado pelo sangue materno no espaço intervilo. A camada externa das vilosidades é formada pelo sinciotrofoblasto multinucleado, uma

camada constituída de microvilosidades com borda em escova, viradas para o sangue materno, e uma membrana basal, virada para a circulação fetal, e que representa a barreira limitante para a transferência placentária da maioria dos fármacos (CECKOVA-NOVOTNA, 2006; MYLLYNEN AND VÄHÄKANGAS, 2013).

A circulação feto-placentária-materna é estabelecida por volta da décima semana de gestação. A barreira placentária pode limitar a distribuição de fármacos administrados para o tratamento do feto, ou administrados para evitar a transmissão materno-fetal de doenças, como os inibidores de proteases. Ademais, a circulação feto-placentária-materna protege o feto contra o efeito de compostos nocivos (CECKOVA-NOVOTNA, 2006; GULATI *et al.*, 2009; RUBINCHIK-STERN AND EYAL, 2012).

A transferência placentária depende das propriedades físico-químicas dos fármacos e das características fisiológicas da unidade mãe-placenta-feto. A exposição fetal aos medicamentos não depende apenas da transferência placentária, mas também da farmacocinética em ambos, mãe e feto. Muitos mecanismos estão envolvidos na transferência de moléculas endógenas e fármacos pela membrana do sinciotrofoblasto e pelos capilares endoteliais fetais. Ela ocorre predominantemente por meio de difusão passiva, aplicada a moléculas com menos de 600 Da, que apresentam caráter hidrofóbico e não ionizadas. Os compostos ligados às proteínas plasmáticas e os fármacos de alto peso molecular não atravessam a placenta, sendo que o transporte por fagocitose e pinocitose não contribui significativamente para a transferência placentária. A metabolização dos fármacos transferidos pode ser realizada tanto pelo fígado imaturo do feto quanto pela placenta. O metabolismo imaturo de fase I e fase II no feto ocorre a partir da oitava semana após a concepção, mas a atividade enzimática é baixa. A eliminação ocorre por difusão de volta para o compartimento materno (DAWES AND CHOWIENCZYK, 2001; CAMUS *et al.*, 2006; GULATI *et al.*, 2009; RUBINCHIK-STERN AND EYAL, 2012).

A placenta expressa várias enzimas metabolizadoras de xenobióticos, mas com capacidade relativamente menor em comparação com o fígado. No entanto, as enzimas placentárias podem catalisar a formação de metabólitos que podem ser fetotóxicos. Essas enzimas participam das reações de fase I (oxidação, redução e hidrólise) e de fase II (conjugação) do metabolismo. Dentre as enzimas de fase I, destaca-se o citocromo P450 (CYP), com as isoformas CYP1A1, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7, 4B1, e 19. As de fase II incluem a Uridina-Difosfato-Glicuronosil-Transferases (UGT), glutathione S-transferase, epóxido hidrolase, N-acetiltransferase e sulfotransferases (RUBINCHIK-STERN, 2012).

A placenta apresenta transportadores de membrana que medeiam a captação de compostos do sangue materno para o feto e a remoção de substrato de volta ao sangue materno, e seu desenvolvimento é dependente da idade gestacional. Dentre os transportadores, destaca-se a glicoproteína-P (P-gp), uma proteína de membrana de 170 kDa, expressa na membrana apical de sinciciotrofoblastos, codificada pelo gene *ABCB1* em humanos, e membro da superfamília ABC (*ATP-Binding Cassette*). A P-gp é um transportador de efluxo ATP-dependente, expressa no fígado, pulmão, adrenal, rins, intestino, e nas barreiras hematoencefálica e placentária. A P-gp na placenta atua na redução da exposição fetal a fármacos, com efluxo de substratos que variam de tamanho, desde pequenos cátions orgânicos, carboidratos, como polissacarídeos, até proteínas. Os substratos da P-gp são geralmente moléculas hidrofílicas, sendo muitas catiônicas, tais como os inibidores de protease, imunossupressores, opióides, antieméticos e antibióticos (CAMUS *et al.*, 2006; CECKOVA-NOVOTNA, 2006; FEGHALI AND MATTISON, 2011; RUBINCHIK-STERN, 2012, IQBAL *et al.*, 2012).

A expressão da P-gp pode ser modulada por inúmeros indutores. Ademais, o transporte de substratos pela P-gp pode ser inibido por bloqueadores, inibidores ou compostos denominados de "*chemosensitizers*" (devido sua capacidade de sensibilizar as células resistentes à ação de fármacos citotóxicos). A inibição da P-gp tem grande impacto na distribuição nos tecidos e na concentração plasmática de seus substratos, trazendo risco de interações fármaco-fármaco, e em contra partida oferece uma ferramenta terapêutica para fármacos-alvo, permitindo atravessar barreiras sangue-tecido (CAMUS *et al.*, 2006; CECKOVA-NOVOTNA, 2006; CECCALDI *et al.*, 2009).

Os níveis da P-gp expressos na placenta podem ser alterados de acordo com o estágio da gravidez e também pela presença do HIV. Em mulheres infectadas pelo vírus HIV, a expressão da P-gp na placenta é cerca de 3,3 vezes maior que em mulheres não infectadas (CAMUS *et al.*, 2006; CECCALDI *et al.*, 2009).

A propagação da infecção pelo HIV entre as mulheres levou ao uso de ARV em gestantes e seus recém-nascidos. No entanto, os inibidores de protease, que são substratos da P-gp, não atravessam a placenta em uma quantidade apreciável, e, portanto, podem não exercer uma atividade direta no útero durante todo o intervalo entre as doses. Além disso, as placentas de mães HIV- positivas expressam níveis significativamente mais elevados de P-gp em comparação com placentas de gestantes saudáveis. Dessa forma, visando aumentar a transferência materno-fetal de ARV, o uso de inibidores da P-gp pode ser uma opção, por aumentar a biodisponibilidade de medicamentos para o feto (CECKOVA-NOVOTNA, 2006).

Deve-se ressaltar o efeito sinérgico entre o CYP3A4 e a P-gp nos processos de desintoxicação, uma vez que a maioria dos compostos que são substratos da P-gp são também substratos do CYP3A4. Os ARV de maneira geral são substratos e indutores de ambos. No entanto, o ritonavir é descrito como inibidor do CYP3A4 e da P-gp (CECKOVA-NOVOTNA, 2006; GULATI *et al.*, 2009; PAL *et al.*, 2011). Segundo Gulati *et al.* (2009), o ritonavir, nelfinavir e indinavir, na concentração de 5 $\mu\text{mol/L}$, aumentam a fluorescência da calceína em células CEM/VBL 100 (células leucêmicas que superexpressam a P-gp), indicando que a P-gp foi inibida.

De acordo com van Waterschoot *et al.* (2010) e Heine *et al.* (2011), o ritonavir aumenta a biodisponibilidade do lopinavir principalmente por inibir o CYP3A4 intestinal, e não o hepático. Ressalta-se ainda que o ritonavir inibe a P-gp apenas na situação de atividade do CYP3A4, sugerindo que a inibição do CYP3A4 intestinal resulta em altas concentrações do ritonavir e na consequente saturação do transportador de efluxo P-gp. Dessa forma, o ritonavir ao nível intestinal preponderantemente inibe o CYP3A4, enquanto a inibição da P-gp só apresenta relevância na situação de baixas concentrações do fármaco em função da atividade do CYP3A4.

1.4 Bupivacaína

Para a analgesia e anestesia obstétrica, as técnicas podem ser separadas em sistêmicas e analgotócias loco-regionais. As técnicas regionais são representadas pela analgesia peridural (epidural), raquianestesia, bloqueio paracervical, bloqueio do nervo pudendo e infiltração perineal, sendo a escolha da técnica de responsabilidade da equipe anestésico-obstétrica. Anestésicos locais e opióides são fármacos normalmente usados e que podem atravessar a placenta no momento do parto. Sendo assim, tais medicamentos devem ser administrados em doses pequenas para evitar a toxicidade no recém-nascido, como depressão do sistema nervoso central, devido ao bloqueio simpático e motor, e toxicidade cardíaca (MOISÉS, 2008; BRUSTUGUN *et al.*, 2013).

A bupivacaína [(±)-1-butil-N-(2,6-dimetilfenil)-2-piperidina carboxamida] é o anestésico mais usado na anestesia epidural obstétrica, devido à sua longa duração da ação. Está disponível comercialmente como mistura racêmica dos enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína, de acordo com a figura 1. Estudos relatam que a administração de pequenas doses deste anestésico em baixas concentrações, produz efeito

analgésico adequado sem afetar o equilíbrio ácido-base do recém-nascido (COX *et al.*, 1998; DUARTE *et al.*, 2011).

Figura 1: Enantiômeros da bupivacaína (SIDEBOTHAM *et al.*, 1997).

Os agentes anestésicos consistem em uma porção hidrofóbica (normalmente um anel aromático) e uma porção hidrofílica (amina terciária), separadas por uma cadeia de ligação, contendo ou éster ou amida. O carbono proximal ao grupo da amina terciária é um comum centro de isomerismo, como mostra a figura 2. Os anestésicos do tipo amida incluem a lidocaína, bupivacaína e prilocaína, e os ésteres incluem a cocaína e ametocaína (SIDEBOTHAM *et al.*, 1997, COLUMB AND MACLENNAN, 2007).

Figura 2: Estrutura química comum de anestésicos locais (COLUMB AND MACLENNAN, 2007).

Os anestésicos locais atuam bloqueando de forma reversível a transmissão do estímulo nervoso no local de aplicação, sem ocasionar alterações no nível de consciência. A bupivacaína bloqueia a ação de canais iônicos na membrana celular neuronal, impedindo a neurotransmissão do potencial de ação. A forma ionizada do anestésico liga-se de modo específico aos canais de sódio voltagem dependentes, inativando-os e impedindo a propagação da despolarização celular. A ligação específica ocorre no meio intracelular, sendo necessária a passagem do anestésico, em sua forma molecular, pela membrana celular (MARTÍN, *et al.*, 2012; VALENZUELA, *et al.*, 2012).

A concentração plasmática *c* depende da dose, da via de administração, da vascularidade do local da injeção, assim como da administração em conjunto com adrenalina, a qual pode reduzir o pico de concentração plasmática da bupivacaína devido sua ação vasoconstritora. A administração intravenosa de bupivacaína racêmica em voluntários sadios mostra *clearance* total de 0,58 L/min, volume de distribuição no estado de equilíbrio de 73 L, meia vida de eliminação de 2,7 h e taxa de extração hepática de 0,38 (intermediária). No plasma, a bupivacaína liga-se à albumina e a alfa-1-glicoproteína ácida, com taxa de ligação proteica de 95%. A bupivacaína liga-se em maior proporção à alfa-1-glicoproteína ácida, uma vez que apresenta *pKa* equivale a 8,2 (SCOTT *et al.*, 1997, SIDEBOTHAM *et al.*, 1997; VEERING *et al.*, 2002).

A bupivacaína é extensivamente metabolizada no fígado, predominantemente por hidroxilação aromática para 4-hidroxibupivacaína e N-desalquilação para PPX (pipecolilxilidina), ambos mediados pelo CYP3A4 e com menor atividade farmacológica. Estudos com microsossomos de fígado humano mostram que a formação do principal metabólito PPX da bupivacaína é dependente do CYP3A4, com pequena contribuição do CYP2C19 e CYP2D6. O metabólito PPX é hidroxilado e conjugado com o ácido glicurônico (GANTENBEIN *et al.*, 2000). Estudos *in vitro* relatam a bupivacaína como substrato da P-gp (VARMA *et al.*, 2003) e estudos em ratos evidenciam interações enantiosseletivas entre os isômeros da bupivacaína e a P-gp (WU *et al.*, 2010).

Os enantiômeros da bupivacaína exibem diferenças na farmacocinética, ligação às proteínas plasmáticas, eficácia e toxicidade. O enantiômero (S)-(-)-bupivacaína está associado a uma maior duração do efeito anestésico e menor toxicidade para o sistema nervoso central e cardiovascular quando comparado ao seu eutômero (R)-(+). Em voluntários saudáveis, o volume de distribuição, o *clearance* e a meia-vida de eliminação são maiores para o enantiômero (+)-(R)-bupivacaína, além de uma maior ligação às proteínas plasmáticas (SCOTT *et al.*, 1997, SIDEBOTHAM *et al.*, 1997, VEERING, *et al.*, 2002). De acordo com

Veering *et al.* (2002), em pacientes saudáveis, os enantiômeros da bupivacaína apresentam alta ligação às proteínas plasmáticas, sendo a fração livre do enantiômero (S)-(-)-bupivacaína de $3,1 \pm 0,8$ % e do enantiômero (R)-(+)-bupivacaína de $4,6 \pm 1,3$ %, com relação (R)-(+)/(S)-(-) igual a $1,51 \pm 0,03$.

Para avaliar a transferência placentária dos enantiômeros da bupivacaína alguns estudos mostram que a taxa de transferência placentária é relativamente baixa para a bupivacaína, sendo de aproximadamente 26% para ambos os enantiômeros (DUARTE *et al.*, 2011). No entanto, em pacientes em tratamento com os ARV zidovudina, lamivudina, lopinavir e ritonavir, a taxa de transferência placentária dos enantiômeros (+)-(R) e (-)-(S)-bupivacaína são próximas a 50% (RIBEIRO, 2012).

Além de a gravidez proporcionar mudanças nas concentrações dos fármacos no plasma devido a alterações na farmacocinética, a infecção pelo HIV resulta em aumento na expressão da P-gp na placenta, enquanto o tratamento com antirretrovirais, incluindo o ritonavir, resulta em inibição do CYP3A4 e em baixas concentrações também da P-gp (CECKOVA-NOVOTNA, 2006; HEINE, *et al.*, 2011; ISOHERRANEN, 2013). Sendo assim, o estudo da disposição cinética e da transferência placentária dos enantiômeros do anestésico bupivacaína, um fármaco substrato da P-gp e com metabolismo dependente do CYP3A4, em parturientes portadoras de HIV em tratamento com antirretrovirais, incluindo o ritonavir, apresenta grande relevância clínica.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a disposição cinética e a transferência placentária dos enantiômeros do anestésico bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento com antirretrovirais.

2.2 Objetivos específicos:

- Desenvolver e validar o método de análise das concentrações plasmáticas dos enantiômeros da bupivacaína empregando LC-MS/MS.
- Desenvolver e validar o método de análise da concentração livre dos enantiômeros da bupivacaína em plasma empregando LC-MS/MS.
- Descrever a farmacocinética dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento com antirretrovirais.
- Avaliar a transferência placentária dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento com antirretrovirais.

Casística e Métodos

3. Casuística e Métodos

3.1 Casuística e protocolo clínico

3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), em sua 372ª Reunião Ordinária realizada em 26/08/2013, Processo HCRP nº 9050/2013 (ANEXO A). O projeto também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP – USP) no dia 18/10/2013 (ANEXO B). O estudo somente foi realizado após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelas parturientes incluídas na pesquisa (ANEXO C), através do qual as parturientes foram informadas em detalhes sobre a proposta do estudo, a duração e os possíveis riscos envolvidos. Foi garantida a liberdade das parturientes em recusar a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu atendimento e/ou tratamento.

Foram investigadas 10 parturientes portadoras do HIV em tratamento (ou profilaxia da transmissão vertical) com zidovudina, lamivudina, lopinavir e ritonavir, internadas para o parto no Centro Obstétrico do HCFMRP-USP.

O diagnóstico do HIV foi realizado de acordo com o Teste Imunoenzimático (ELISA). O diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV foi confirmado após a análise de no mínimo duas amostras de sangue coletadas em momentos diferentes (PORTARIA MS/SVS-Nº59 de 28/01/03).

Foram incluídas as parturientes com faixa etária de 18 a 35 anos, com idade gestacional de 36-42 semanas, sendo todas com gestação única e com ausência de intercorrências fetais. Todas as parturientes investigadas mostraram funções hepática (dosagem sérica de bilirrubinas, AST, ALT e γ -GT) e renal (dosagem sérica de ureia e creatinina) dentro dos limites da normalidade. As funções renal e hepática foram avaliadas no momento do parto através da coleta de 3 tubos de sangue de 10mL de cada parturiente.

Foram excluídas as parturientes com resolução do parto decorrente de urgência/emergência obstétrica, parturientes em uso crônico de outras medicações exceto os ARV, parturientes que apresentaram carga viral acima do limite de detecção e as que não concordaram em participar do estudo.

3.1.2 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo do tamanho amostral foi obtido utilizando o programa *Power and Sample Calculation* versão 2.1.30 (DUPONT; PLUMER, 1997), empregando os dados de área sob a curva concentração plasmática versus tempo (AUC) da bupivacaína obtidos no procedimento anestésico de parturientes saudáveis para a resolução do parto cesáreo. Para o cálculo do tamanho amostral o nível de significância foi fixado em 5% e o poder do teste em 80%. Os dados de

AUC do anestésico foram obtidos de um estudo anterior do grupo de investigação de parturientes sadias, de acordo com os relatos de Papini *et al.* (2004) relativos a AUC média $\pm$ DP de $1318,49 \pm 391,76$ ng.h/mL para o enantiômero (R)-(+)-bupivacaína.

Como pode ser observado na Figura 3, a inclusão de 10 parturientes portadoras do HIV em tratamento com antirretrovirais resultou em poder do teste acima de 80 %.

Figura 3. Gráfico do tamanho da amostra em função do poder do teste no estudo da bupivacaína.

3.1.3 Procedimento de anestesia loco regional por via epidural e coletas seriadas de sangue

O procedimento de anestesia loco-regional por via epidural foi realizado com a paciente em posição sentada, com as mãos apoiadas no joelho, ombros relaxados e pescoço fletido. Antecedendo o procedimento de anestesia, foi realizada a assepsia da região da coluna lombossacra da parturiente e colocação de campos estéreis.

A anestesia foi realizada pela equipe de Anestesia do Centro Obstétrico do HC-FMRP-USP, com a administração dentro do espaço peridural de dose única de 25 mL de cloridrato de bupivacaína racêmica 0,5% com epinefrina 1:200000 (Marcaína®, Cristália, Itapira, SP). Durante todo o procedimento, a paciente foi monitorada em relação à oximetria de pulso, frequência cardíaca e pressão arterial. Após o término da infusão do anestésico, as parturientes foram colocadas em decúbito dorsal horizontal, procedendo-se o teste de sensibilidade nos dermatômos abdominais e torácicos, com a finalidade de avaliar o nível atingido pela anestesia. O procedimento cirúrgico só era liberado após a verificação do sucesso do procedimento anestésico.

A analgesia realizada para o parto vaginal foi realizada com a administração no espaço epidural de dose única de 5 mL de cloridrato de bupivacaína racêmica 0,5% com epinefrina 1:200000 (Marcaína®, Cristália), seguindo os mesmos procedimentos descritos na anestesia.

As amostras seriadas de sangue (10 mL cada) foram obtidas em seringas com heparina (Liquemine 5000 UI, Roche), via cateter intravenoso, nos tempos imediatamente antes, 5, 15, 30, 45 e 60 min e em 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14h após a administração do anestésico bupivacaína.

No momento do parto, também foram coletadas, simultaneamente, amostras de sangue materno e sangue do cordão umbilical para determinar a taxa de transferência placentária da bupivacaína. A coleta de sangue do cordão umbilical só foi efetuada após o clampeamento e secção do cordão umbilical, não oferecendo riscos para mãe e para o bebê.

3.2 Métodos

3.2.1 Análise dos enantiômeros da bupivacaína em plasma

O método de análise dos enantiômeros da bupivacaína em plasma foi desenvolvido e validado com base em estudo anterior do grupo descrito por Ribeiro (2012).

3.2.1.1 Soluções padrão e Reagentes

A solução estoque de bupivacaína racêmica (99%) (cloridrato de bupivacaína; Sigma, St Louis, MO, EUA) foi preparada na concentração de 100 µg de cada enantiômero/mL de metanol. A partir dessa solução foram realizadas diluições para obtenção das soluções de uso, nas concentrações 2; 4; 10; 20; 40; 160; 200; 800; 1600 e 4000 ng de cada enantiômero/mL de metanol. A ropivacaína, homólogo propil da bupivacaína, foi utilizada como padrão interno – PI (cloridrato de (S)-ropivacaína 100,1%; Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos, Itapira, SP, Brasil). A solução estoque de ropivacaína foi preparada na concentração de 50 µg/mL de metanol e diluída para 1,25 ng/mL de metanol.

O metanol, solvente empregado na diluição das soluções padrão foi obtido da LICHROSOLV® Merck® (Darmstadt - Alemanha), a acetonitrila utilizada na etapa de desproteinização durante o preparo das amostras foi obtida da LICHROSOLV® Merck® (Darmstadt - Alemanha), o solvente extrator, n-hexano 95%, utilizado para o preparo das amostras e na constituição da fase móvel assim como o etanol absoluto, utilizado também como constituinte da fase móvel, foram obtidos da Panreac (Barcelona, Espanha), todos como grau cromatografia. O hidróxido de sódio utilizado para alcalinizar o meio durante a extração do analito foi obtido da JTBaker® (Estado do México, México). A água utilizada na etapa de desproteinização durante o preparo das amostras foi obtida em sistema de purificação Sinergy UV® (Millipore, Molsheim, França).

3.2.1.2 Instrumentação

A separação dos enantiômeros da bupivacaína foi obtida na coluna de fase quiral Chirex® 3020 (Phenomenex, Torrance, CA, EUA) de 250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm, mantida à 23°C. A fase móvel utilizada foi constituída de 80% de n-hexano 95% e 20% de etanol absoluto, na vazão de 0,8 mL/min.

O sistema de detecção por espectrometria de massas (MS/MS) foi composto por bomba gradiente binária Waters 1525 µ, injetor automático 2777, forno de coluna TCM/CHM e espectrômetro de massas triplo quadrupolo XEVO TQ-S, todos da Waters (Milford, EUA) equipado com interface de ionização por eletronebulização operando no modo íon positivo. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 150 e 500°C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 400 L/h. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na pressão de aproximadamente $2,78 \times 10^{-3}$ mbar. A voltagem do cone foi mantida em 2 V para os enantiômeros da bupivacaína e para o PI. A energia de colisão foi de 20 eV para ambos os fármacos. As condições de otimização do MS/MS foram

obtidas por infusão direta das soluções padrão preparadas na fase móvel, na vazão de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

As determinações foram executadas no modo MRM (Monitoramento de reações múltiplas). Os íons protonados $[\text{M} + \text{H}]^+$ e seus respectivos íons produtos foram monitorados nas transições 289>140 para os enantiômeros da bupivacaína e 275>106,1 para o PI. A aquisição e a quantificação dos dados foram realizadas utilizando o programa MassLynx versão 4.1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

3.2.1.3 Preparo das amostras

As amostras de plasma branco de voluntários sadios (não tratados com bupivacaína) foram obtidas do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Em tubos de vidro de extração, alíquotas de 200 μL de plasma branco foram enriquecidas com 25 μL da solução de uso do padrão interno (ropivacaína). Para a etapa de desproteinização da matriz, as amostras foram adicionadas de 2 mL de água milli-Q e 2 mL de acetonitrila, os tubos foram vedados, agitados em *mixer* por 2 min e centrifugados durante 10 min a 2000 rpm (centrífuga refrigerada Hitachi® modelo CF8DL, Tokyo, Japão). Após a etapa de centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de vidro de extração e adicionados de 0,5 mL de solução recém-preparada de hidróxido de sódio 0,5 mol/L e 6 mL de n-hexano 95% como solvente extrator. Os tubos foram vedados, agitados em *mixer* por 1 min e centrifugados por 10 min a 2000 rpm (centrífuga refrigerada Hitachi® modelo CF8DL, Tokyo, Japão). As fases orgânicas foram separadas, transferidas para tubos cônicos de vidro e evaporadas em concentrador a vácuo de amostras (Christ RCV 2-25 CO plus e Christ CT 04-50 SR). Finalmente, os resíduos foram reconstituídos com 1 mL da fase móvel e volumes de 10 μL foram introduzidos no sistema cromatográfico para a análise.

3.2.1.4 Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado utilizando-se 8 amostras de plasma, sendo 4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas. Os plasmas foram processados de acordo com o item 4.2.3.3. O PI e a bupivacaína foram acrescentados após o processamento, nas mesmas concentrações das amostras de CQB (Controle de Qualidade de baixa concentração – 4 ng/mL plasma) e CQA (Controle de Qualidade de alta concentração - 400 ng/mL plasma). Para cada amostra foi calculado o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a fórmula a seguir:

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

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

3.2.2 Validação do método de análise dos enantiômeros da bupivacaína em plasma

O método de análise dos enantiômeros da bupivacaína em plasma foi validado de acordo com as recomendações da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012) para métodos bioanalíticos.

3.2.2.1 Curva de calibração/Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada através da análise de três curvas de calibração, construídas através de alíquotas de 200 µL de plasma branco enriquecidas com 25 µL de cada solução padrão de bupivacaína nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,25; 2,5; 5,0; 20; 25; 100; 200 e 500 ng de cada enantiômero da bupivacaína/mL de plasma e incluindo a análise da amostra branco (sem analito e padrão interno) e da amostra zero (contendo apenas padrão interno).

Para que as curvas sejam aprovadas, 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.

3.2.2.2 Limite inferior de quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi definido como a menor concentração quantificada de cada enantiômero com CV de até 20% e porcentagem de inexatidão de $\pm 20\%$. Foram avaliadas 10 amostras enriquecidas com bupivacaína na concentração de 0,25 ng de cada enantiômero/mL de plasma.

3.2.2.3 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas através de estudos intra e intercorridas. Os estudos foram realizados nas concentrações de 0,25 (Limite inferior de quantificação-LIQ); 4 (Controle de qualidade de baixa concentração-CQB); 250 (Controle de qualidade de média concentração-CQM); 400 (Controle de qualidade de alta concentração-CQA) e 720 (1:4) (Controle de qualidade de diluição-CQD) ng de cada enantiômero/mL de plasma. Estas soluções foram separadas em alíquotas e armazenadas a -70 °C até a análise.

Para a avaliação da precisão e da exatidão intra-corrida foram analisadas 5 alíquotas destas soluções através de uma única curva de calibração. Na avaliação da precisão e da exatidão intercorridas foram analisadas 5 alíquotas de cada uma das soluções de bupivacaína durante 3 diferentes corridas.

A avaliação da precisão intra e intercorridas foi realizada através do cálculo do CV dos resultados obtidos. Para que o método possa ser referido como preciso, o CV deve ser igual ou inferior a 15%, exceto para o LIQ, com aceitação de 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:

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

3.2.2.4 Estabilidade

Para a avaliação da estabilidade dos enantiômeros da bupivacaína foram preparadas amostras de plasma branco enriquecidas com 4 (CQB) e 400 (CQA) ng de cada enantiômero/mL de plasma humano.

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. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos após a análise das amostras recém-preparadas.

Para a avaliação da estabilidade pós-processamento, as amostras extraídas foram mantidas no auto-injetor por um período de 16 h, e injetadas no sistema cromatográfico. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos após a análise das amostras recém-preparadas.

Para a avaliação da estabilidade de curta duração as amostras enriquecidas foram mantidas na bancada por 5 h. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos após a análise das amostras recém-preparadas.

Os resultados dos estudos de estabilidade foram expressos em porcentagem de desvio e não devem ultrapassar 15%.

3.2.3 Análise da concentração livre dos enantiômeros da bupivacaína em plasma

Para a análise da concentração livre dos enantiômeros da bupivacaína, alíquotas de plasma foram acondicionadas em dispositivo de ultrafiltração Centrifree® (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) e centrifugadas a 1875 g durante 40 min em centrífuga com rotor de eixo fixo (ângulo de 36 graus) (modelo NT 825, Nova Técnica, Piracicaba, Brasil), refrigerada a 4°C para a obtenção do ultrafiltrado do plasma. O processo de ultrafiltração do plasma humano está descrito na Figura 4. Alíquotas do ultrafiltrado foram submetidas ao procedimento de extração líquido-líquido descrito para a análise da concentração total. O método foi desenvolvido empregando LC-MS/MS e validado de acordo com a Resolução ANVISA RDC n.27 de 17 de maio de 2012 para validação de métodos bioanalíticos.

Figura 4 - Ultrafiltração do plasma humano. Antes da ultrafiltração, o fármaco encontra-se parcialmente livre no plasma e parcialmente ligado às proteínas plasmáticas (A). Durante a ultrafiltração, o fármaco livre atravessa a membrana junto com o solvente (plasma). A concentração do fármaco livre no ultrafiltrado é a mesma da amostra acima da membrana (B) (MILLIPORE CORP, 2011, 2012).

3.2.4 Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da bupivacaína foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática total *versus* tempo. Foi empregado o programa WinNonlin, versão 4.0 (Pharsight Corporation, Mountain View, Califórnia, EUA). A área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo foi calculada pelo método dos trapezoides com extrapolação para o infinito (GABRIELSSON; WEINER, 2000).

A concentração livre dos enantiômeros da bupivacaína no plasma foi avaliada no tempo de observação da concentração plasmática máxima ($C_{\max}$) para cada parturiente. A fração livre no plasma (F_u) foi determinada conforme a equação:

$$F_u = \frac{[\text{concentração livre no plasma}]}{[\text{concentração total no plasma}]}$$

3.2.5 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do software RStudio® para obtenção da média, mediana, percentil 25, percentil 75 e intervalo de confiança 95% (IC 95%). Em todos os testes estatísticos o nível de significância foi fixado em 5%.

Resultados

4. Resultados

4.1 Características das parturientes investigadas

A fase de recrutamento das parturientes foi realizada no Ambulatório de Moléstias Infectocontagiosas em Ginecologia e Obstetrícia (AMIGO) do HCFMRP – USP, sendo selecionadas 10 parturientes portadoras do HIV em tratamento com antirretrovirais. Os dados demográficos das parturientes internadas durante o parto estão apresentados na Tabela 1 como mediana (percentis 25 e 75) e no APÊNDICE A (Tabela i) como valores individuais. A idade das pacientes expressa em mediana foi de 30,5 anos, a idade gestacional foi de 39 semanas e 5 dias, o peso gestacional foi de 75,8 Kg e o IMC gestacional foi de 28,33 Kg/m². As pacientes investigadas não apresentaram efeitos adversos durante o período do estudo.

Tabela 1: Características das pacientes investigadas (n=10).

Parâmetros	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
Idade (anos)	23	30,5	35
Peso (Kg)	65,62	75,8	87,55
Altura (m)	1,55	1,59	1,64
IMC (Kg/m ²)	26,27	28,33	34,11
IG (semanas(s) e dias(d))	38,5	39s e 5d	40,82

IMC: Índice de Massa Corporal, calculado como a razão entre o peso e a altura ao quadrado; IG: Idade Gestacional, dado em semanas (s) e dias (d).

Todas as parturientes realizaram pré-natal de maneira satisfatória, segundo os critérios do Ministério da Saúde. Foram realizados exames clínicos e laboratoriais para a avaliação da função hepática (TGP/ALT, TGO/AST, gama-GT, bilirrubina total e frações e fosfatase alcalina), função renal (uréia, creatinina, sódio e potássio), avaliação metabólica (colesterol, triglicérides, HDL, LDL e glicemia de jejum) e avaliação hematológica. Os valores dos referidos exames para as parturientes estão apresentados nos APÊNDICES B e C como valores individuais. Todas as parturientes apresentaram sorologias negativas para o vírus da Hepatite B (HBsAg), para Sífilis (VDRL) e para Toxoplasmose. Ainda, apresentaram exame parasitológico de fezes, Urina I e urocultura negativos.

A internação para a resolução do parto aconteceu entre 37 a 41 semanas de gestação. Todas as parturientes investigadas apresentaram carga viral < 40 cópias/mL (abaixo do limite de detecção), sendo 7 submetidas à resolução do parto por via natural e 3 submetidas à resolução do parto por via abdominal (cesárea) de acordo com a conduta médica.

4.2 Características dos recém-nascidos

Os recém-nascidos das parturientes investigadas não apresentaram doenças diagnosticadas ao nascer. Os valores de peso e altura ao nascer estão apresentados na Tabela 2 como mediana (percentis 25 e 75) e no APÊNDICE A (Tabela ii) como valores individuais.

Todos os recém-nascidos apresentaram Índice de Apgar maior ou igual a 7 no 1º min e de 9 a 10 no 5º min. Estes recém-nascidos apresentaram evolução favorável no período pós-natal e receberam alta hospitalar no mesmo momento da alta materna, após 48 h da internação para a resolução do parto.

O peso das placentas foi de 430 a 725 g, sendo que as placentas eram discóides e nenhuma apresentou alterações macroscópicas relevantes (Tabela 2).

Tabela 2: Características dos recém-nascidos (n=10).

Parâmetros	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
Peso do recém-nascido (g)	2261,25	2420	2808,75
Estatuta (cm)	45	46,25	47,37
Peso da placenta (g)	457,5	495	565

4.3 Validação do método de análise da concentração total dos enantiômeros da bupivacaína em plasma

A Figura 5 mostra os íon protonado $[M + H]^+$ e seu respectivo íon produto monitorados nas transições 289>140 para os enantiômeros da bupivacaína.

Figura 5: Espectro de massas do íon protonado (A) e íon produto (B) para os enantiômeros da bupivacaína.

A Figura 6 mostra o íon protonado $[M + H]^+$ e seu respectivo íon produto monitorados nas transições 275>106 para a ropivacaína - PI.

Figura 6: Espectro de massas do íon protonado (A) e íon produto (B) para a ropivacaína – PI.

A Figura 7 apresenta os cromatogramas referentes à análise de plasma branco nas transições dos enantiômeros da bupivacaína e ropivacaína (PI).

Figura 7: Cromatogramas referentes à análise de plasma branco. (A) Plasma humano branco, referente à transição dos enantiômeros da bupivacaína; (B) Plasma humano branco, referente à transição da (S)-ropivacaína.

A Figura 8 apresenta os cromatogramas referentes aos tempos de retenção do (+)-(R)-bupivacaína, (-)-(S)-bupivacaína e (S)-ropivacaína (PI), indicando que os fármacos são eluídos na sequência (+)-(R)-bupivacaína (5,26 min), (-)-(S)-bupivacaína (5,87 min) e PI (6,35 min), totalizando 8 min de tempo de corrida total.

Figura 8: Cromatogramas referentes aos tempos de retenção dos enantiômeros (+)-(R)-bupivacaína e (-)-(S)-bupivacaína e da (S)-ropivacaína - PI.

O efeito matriz foi avaliado em 8 amostras de plasma branco enriquecidas com bupivacaína nas concentrações de 4,0 (CQB) e 400,0 (CQA) ng de cada enantiômero/mL de plasma, sendo 4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas. Os CVs dos FMNs relativos a todas as amostras analisadas foram inferiores a 15 % (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeito matriz para os enantiômeros (+)-(R)-bupivacaína e (-)-(S)-bupivacaína em 8 diferentes lotes de plasma branco, sendo 4 normais, 2 lipêmicos e 2 hemolisados.

Efeito Matriz (CV%)	
(R)-(+)-bupivacaína	(S)-(-)-bupivacaína
7,2	9,1
CV (%) = Desvio padrão/média * 100	

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos na validação do método de análise dos enantiômeros da bupivacaína em plasma.

Tabela 4 – Parâmetros de validação do método de análise da concentração total dos enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína em plasma.

	(R)-(+)-bupivacaína	(S)-(-)-bupivacaína
Linearidade (ng/mL)	0,25 – 500	0,25 – 500
Equação da reta	$y = 10,237x - 1,7245$	$y = 8,4009x + 1,8102$
Coeficiente de correlação linear	$r = 0,99904$	$r = 0,99835$
LIQ (ng/mL)	0,25	0,25
Precisão (CV %, n = 10)	5,61	5,29
Exatidão (Inexatidão %)	1,22	1,14
Precisão intercorridas (CV %)		
LIQ - 0,25 ng/mL (n=5)	12,41	13,57
CQB - 4,0 ng/mL (n=5)	11,71	11,96
CQM - 250 ng/mL (n=5)	4,57	5,70
CQA - 400 ng/mL (n=5)	7,97	6,99
CQD - 720 ng/mL (1:4) (n=5)	10,02	9,06
Precisão intra-corrida (CV %)		
LIQ - 0,25 ng/mL (n=5)	8,57	8,18
CQB - 4,0 ng/mL (n=5)	5,97	5,53
CQM - 250 ng/mL (n=5)	2,41	2,96
CQA - 400 ng/mL (n=5)	5,32	4,74
CQD - 720 ng/mL (1:4) (n=5)	7,18	7,30
Exatidão intercorridas (EPR %)		
LIQ - 0,25 ng/mL (n=5)	- 13,49	- 4,32
CQB - 4,0 ng/mL (n=5)	- 6,19	- 6,04
CQM - 250 ng/mL (n=5)	12,51	12,32
CQA - 400 ng/mL (n=5)	- 6,19	3,68
CQD - 720 ng/mL (1:4) (n=5)	12,51	- 6,64
Exatidão intra-corrida (EPR %)		
LIQ - 0,25 ng/mL (n=5)	- 5,04	6,08
CQB - 4,0 ng/mL (n=5)	1,46	8,59
CQM - 250 ng/mL (n=5)	11,61	12,21
CQA - 400 ng/mL (n=5)	- 3,19	- 1,82
CQD - 720 ng/mL (1:4) (n=5)	2,61	- 0,94

CV= coeficiente de variação (desvio padrão/concentração média experimental)*100

EPR= erro padrão relativo (concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal * 100

LIQ= limite inferior de quantificação do método

CQB= controle de qualidade de baixa concentração

CQM= controle de qualidade de média concentração

CQA= controle de qualidade de alta concentração

CQD= controle de qualidade de diluição

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos na estabilidade do método de análise dos enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína em plasma.

Tabela 5 – Estudo de estabilidade dos enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína em plasma.

Estabilidade (Desvio %)	(R)-(+)-bupivacaína	(S)-(-)-bupivacaína
Ciclos de congelamento/descongelamento		
(24h)		
CQB - 4 ng/mL (n=3)	3,33	3,77
CQA - 400 ng/mL (n=3)	11,99	12,25
Curta duração (5h)		
CQB - 4 ng/mL (n=3)	8,06	3,43
CQA - 400 ng/mL (n=3)	8,20	5,70
Pós Processamento (16h)		
CQB - 4 ng/mL (n=3)	4,88	4,34
CQA - 400 ng/mL (n=3)	1,94	2,12

% desvio em relação às amostras recém-preparadas.

CQB= controle de qualidade de baixa concentração

CQA= controle de qualidade de alta concentração

4.4 Análise farmacocinética dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV

O modelo monocompartimental foi utilizado para análise dos dados referentes à concentração plasmática dos enantiômeros da bupivacaína *versus* tempo.

A tabela 6 e a figura 9, mostram a disposição cinética dos enantiômeros da bupivacaína avaliada em 10 parturientes portadora do HIV em tratamento com antirretrovirais com administração da anestesia loco-regional por via epidural com dose única de cloridrato de bupivacaína racêmica 0,5% com epinefrina 1:200000.

Tabela 6 – Parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros (+)-(R)-bupivacaína e (-)-(S)-bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento com ARV tratadas com dose única de cloridrato de bupivacaína racêmica 0,5% via epidural. Os dados estão apresentados como mediana (Percentil 25-75).

Parâmetros	(R)-(+)-bupivacaína	(S)-(-)-bupivacaína
AUC^{0-∞}/dose (10 ⁻⁶ h.mL ⁻¹)	22,06 (18,24 – 37,73)	21,38* (19,65 – 43,52)
C_{max}/dose (10 ⁻⁶ mL ⁻¹)	2,53 (1,93 – 2,96)	2,77* (2,26 – 3,25)
t_{1/2} (h)	6,52 (5,72 – 7,85)	5,77 (4,98 – 6,69)
Cl/F (L/h)	45,48 (29,32 – 54,87)	46,87 (24,94 – 50,91)
V_{ss}/F (L)	397,95 (338,89 – 517,08)	361,9* (308,07 – 442,21)
AUC_{(R)/(S)}	0,91* (0,82 – 0,99)	

*teste de Wilcoxon para dados pareados; p<0,05

AUC^{0-∞}: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo; C_{max}: concentração plasmática máxima; t_{1/2}: meia-vida de eliminação; Cl/F: *clearance* aparente; V_{ss}/F: volume de distribuição aparente.

Figura 9: Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV (n=10) em tratamento com ARV após administração via epidural de dose única de cloridrato de bupivacaína racêmica. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão para as parturientes tratadas com doses de 22,5 mg (n=2); 12,5 mg (n=1) ou 2,5 mg (n=7) de bupivacaína racêmica.

4.5 Avaliação da transferência placentária dos enantiômeros da bupivacaína

Na tabela 7 estão apresentados os valores individuais como concentração total dos enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína nas amostras de plasma materno e plasma da veia do cordão umbilical das parturientes portadoras do HIV.

Tabela 7: Concentrações plasmáticas dos enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína em amostras coletadas no momento do parto de parturientes tratadas com dose única via epidural de cloridrato de bupivacaína racêmica. Dados individuais.

Parturientes	(R)-(+)-bupivacaína		(S)-(-)-bupivacaína	
	veia materna (ng/mL)	veia umbilical (ng/mL)	veia materna (ng/mL)	veia umbilical (ng/mL)
1	96,90	40,86	103,265	39,232
2	8,46	4,10	8,51	4,91
3	3,51	2,20	4,03	2,404
4	10,80	5,26	14,07	6,08
5	5,47	2,55	6,96	2,141
6	17,97	4,89	23,49	6,055
7	6,06	5,6	6,70	2,592
8	89,01	43,54	113,23	46,427
9	8,93	3,67	11,36	4,421
10	4,78	2,69	5,63	2,155

Na Tabela 8 estão apresentados os dados de transferência placentária dos enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína. Os dados estão expressos como valores individuais e medianas (percentis 25 e 75).

Tabela 8: Transferência placentária (veia umbilical/veia materna) dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV. Dados individuais, medianas e percentis 25-75.

	(R)-(+)-bupivacaína	(S)-(-)-bupivacaína
Parturientes	veia umbilical/ veia materna	veia umbilical/ veia materna
1	0,42	0,38
2	0,48	0,58
3	0,63	0,60
4	0,49	0,43
5	0,46	0,31
6	0,27	0,26
7	0,43	0,39
8	0,49	0,41
9	0,41	0,39
10	0,60	0,39
Mediana	0,47	0,39*
Percentil 25	0,42	0,38
Percentil 75	0,49	0,42

*teste de Wilcoxon para dados pareados; $p < 0,05$

4.6 Validação do método de análise da concentração livre dos enantiômeros da bupivacaína em plasma

Para a determinação da concentração livre dos enantiômeros da bupivacaína, alíquotas de 1 mL de plasma foram acondicionadas em dispositivo de ultrafiltração Centrifree®, como demonstrado na figura 10 e centrifugadas a 1875 g durante 40 min em centrífuga com rotor de eixo fixo, refrigerada a 4 °C para a obtenção do ultrafiltrado do plasma (300 µL). Cada unidade do dispositivo destina-se a uma única utilização e consiste em um copo de filtrado removível fixado à base e em uma membrana e em um anel vedante permanentemente selados entre o reservatório de amostra e a base do suporte.

Figura 10: Dispositivo de ultrafiltração Centrifree® (MILLIPORE, CARRIGTWOHILL, IRLANDA)

Alíquotas de 200 μL do ultrafiltrado foram submetidas ao mesmo procedimento de extração líquido-líquido com n-hexano em pH alcalino descrito para a análise da concentração total dos enantiômeros da bupivacaína em plasma, e posterior análise por LC-MS/MS nas condições também já descritas.

Após a evaporação da fase orgânica em concentrador a vácuo de amostras, os resíduos foram reconstituídos com 200 μL de fase móvel e volumes de 50 μL foram introduzidos no sistema cromatográfico para a análise, visando um aumento do sinal analítico.

O efeito matriz foi avaliado em 8 amostras de ultrafiltrado enriquecidos com bupivacaína nas concentrações de 0,375 (CQB) e 10 (CQA) ng de cada enantiômero/mL de plasma, sendo os ultrafiltrados provenientes de 4 plasmas normais, 2 lipêmicos e 2 hemolisados. Os CVs dos FMNs relativos a todas as amostras analisadas foram inferiores a 15 %, como descrito na Tabela 9.

Tabela 9 – Efeito matriz para os enantiômeros (+)-(R)-bupivacaína e (-)-(S)-bupivacaína em 8 diferentes lotes de ultrafiltrado branco, sendo 4 normais, 2 lipêmicos e 2 hemolisados.

Efeito Matriz (CV%)	
(R)-(+)-bupivacaína	(S)-(-)-bupivacaína
9,91	6,28
CV (%) = Desvio padrão/média * 100	

A Tabela 10 mostra os resultados obtidos na validação do método de análise da concentração livre dos enantiômeros da bupivacaína em plasma.

Tabela 10 – Parâmetros de validação do método de análise da concentração livre dos enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína em plasma.

	(R)-(+)-bupivacaína	(S)-(-)-bupivacaína
Linearidade (ng/mL)	0,125 – 10	0,125 – 10
Equação da reta	$y = 8,3093x - 0,1731$	$y = 8,6462x - 0,7772$
Coefficiente de correlação linear	$r = 0,9918$	$r = 0,9956$
LIQ (ng/mL)	0,125	0,125
Precisão (CV %, n = 10)	10,31	8,10
Exatidão (Inexatidão %)	-1,14	3,82
Precisão intercorridas (CV %)		
LIQ - 0,125 ng/mL (n=5)	10,61	8,93
CQB - 0,375 ng/mL (n=5)	14,51	8,14
CQM - 4 ng/mL (n=5)	14,47	11,57
CQA - 7,5 ng/mL (n=5)	14,82	8,97
Precisão intra-corrida (CV %)		
LIQ - 0,125 ng/mL (n=5)	1,84	3,37
CQB - 0,375 ng/mL (n=5)	7,74	4,59
CQM - 4 ng/mL (n=5)	8,56	7,72
CQA - 7,5 ng/mL (n=5)	10,19	7,01
Exatidão intercorridas (EPR %)		
LIQ - 0,125 ng/mL (n=5)	2,03	-5,2
CQB - 0,375 ng/mL (n=5)	10,06	- 1,88
CQM - 4 ng/mL (n=5)	5,74	14,60
CQA - 7,5 ng/mL (n=5)	- 13,01	-0,07
Exatidão intra-corrida (EPR %)		
LIQ - 0,125 ng/mL (n=5)	-9,33	-0,16
CQB - 0,375 ng/mL (n=5)	1,56	-0,8
CQM - 4 ng/mL (n=5)	12,23	5,65
CQA - 7,5 ng/mL (n=5)	- 6,87	- 1,73

CV= coeficiente de variação (desvio padrão/concentração média experimental) *100

EPR= erro padrão relativo (concentração média experimental - valor nominal) /valor nominal * 100

LIQ= limite inferior de quantificação do método

CQB= controle de qualidade de baixa concentração

CQM= controle de qualidade de média concentração

CQA= controle de qualidade de alta concentração

CQD= controle de qualidade de diluição

A determinação da concentração livre dos enantiômeros da bupivacaína em plasma foi realizada com as amostras das parturientes referentes ao tempo de observação da concentração plasmática máxima ($C_{\max}$). As amostras das pacientes nos referidos tempos foram submetidas ao processo de ultrafiltração para obtenção do ultrafiltrado, e posteriormente essas alíquotas foram extraídas com n-hexano em pH alcalino, como descrito anteriormente, e analisadas por LC-MS/MS nas mesmas condições.

Os valores de fração livre no plasma (F_u) para os enantiômeros da bupivacaína encontram-se na tabela 11 como mediana (Percentis 25 e 75) e no APÊNDICE D (Tabela vii) como valores individuais.

Tabela 11– Fração livre no plasma (F_u) para os enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína. Os dados estão apresentados como medianas (Percentis 25 e 75).

Enantiômeros	Fração Livre (F_u)
(R)-(+)-bupivacaína	0,09 (0,06-0,12)
(S)-(-)-bupivacaína	0,06* (0,04-0,09)

*teste de Wilcoxon para dados pareados; $p < 0,05$

Discussão

5. Discussão

O presente estudo relata a disposição cinética dos enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína em parturientes portadoras do HIV, em terapia com antirretrovirais, tratadas com dose única de cloridrato de bupivacaína racêmica via epidural, em doses de analgesia de 2,5 mg até doses de anestesia de 12,5 e 22,5 mg.

Todas as parturientes investigadas (n=10) foram submetidas à avaliação das funções metabólica, renal e hepática, 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, exceto a discreta elevação da fosfatase alcalina em 6 parturientes, dislipidemia e redução de alfa-1-glicoproteína ácida em 7 parturientes e as outras 3 ficaram próximas ao limite inferior de referência (APÊNDICE B). A elevação da fosfatase alcalina é explicada pelo fato de que a placenta produz fosfatase alcalina, além do fígado, intestino, rins e ossos, dessa forma, no período gestacional existe um local extra de produção da enzima (DARBY *et al.*, 2011). A dislipidemia observada nas parturientes investigadas está de acordo com dados da literatura de que pacientes com a infecção pelo HIV, particularmente aqueles com anormalidades da composição corporal associados, tem um perfil de dislipidemia com diminuição do HDL e aumento do colesterol total, LDL e triglicérides. Isso pode ser associado à própria infecção do HIV e aos ARV utilizados, em particular aos inibidores de protease (STANLE AND GRINSPOON, 2012; PINTO NETO *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013). A redução da alfa-1-glicoproteína ácida foi observada em 7 das 10 parturientes investigadas porque os níveis dessa proteína plasmática podem ser modificados durante a infecção pelo HIV e pela gestação (GAVARD, *et al.*, 2006). Ressalta-se ainda que em 7 parturientes investigadas, valores discretamente abaixo daqueles considerados referência também foram observados para a hemoglobina (APÊNDICE C). Essa diminuição pode ser atribuída aos ARV utilizados para o controle da infecção viral e para profilaxia da transmissão vertical do HIV (VOLBERDING, 2002).

A avaliação da farmacocinética dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes exigiu o desenvolvimento e a validação de um método para a determinação dos enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína em plasma com sensibilidade compatível com as concentrações plasmáticas até 14 h após a administração do anestésico no momento do parto.

O método para a determinação dos enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína em plasma foi desenvolvido empregando LC-MS/MS e validado de acordo com

as recomendações da ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012) para métodos bioanalíticos.

Os enantiômeros da bupivacaína foram eluídos da coluna de fase quiral Chirex 3020 empregando fase móvel constituída de n-hexano e etanol (80:20; v/v), como anteriormente descrito por Ribeiro, 2012. Os enantiômeros foram eluídos na sequência (R)-(+)-bupivacaína (5,26 min) e (S)-(-)-bupivacaína (5,87 min), seguidos pelo padrão interno (S)-ropivacaína (6,35 min), totalizando aproximadamente 8 min de tempo de corrida cromatográfica (Figura 8). Ressalta-se que Papini *et al.* (2004), empregando a coluna de fase quiral Chiracel ODR, relatam tempo de corrida cromatográfica de aproximadamente 13 min para a eluição dos enantiômeros da bupivacaína na ausência de padrão interno. Durante o período de padronização do método, de acordo com Ribeiro (2012), testou-se infusão pós-coluna constituída de etanol e acetato de amônio 10 mmol/L, na proporção (95:5) para auxiliar na ionização dos enantiômeros e do padrão interno. No entanto, a retirada da infusão pós-coluna melhorou a ionização do padrão interno, o qual estava com muita variação, e aumentou a sensibilidade do método proposto.

Os enantiômeros da bupivacaína e o padrão interno (S)-ropivacaína foram extraídos de alíquotas de 200 µL de plasma empregando desproteinização com acetonitrila seguida de extração em meio básico com n-hexano (RIBEIRO, 2012). Os valores de recuperação obtidos foram próximos a 100% para ambos os enantiômeros da bupivacaína e para o padrão interno, portanto com valores superiores aos reportados por Ribeiro (2012), aproximadamente 60% para ambos os enantiômeros, e Papini *et al.* (2004), aproximadamente 80% para ambos os enantiômeros, empregando os mesmos procedimentos de desproteinização com acetonitrila e extração em meio básico com n-hexano. Os maiores valores de recuperação podem ser explicados em função da maior proporção de solvente extrator em relação ao volume de plasma (6 mL de n-hexano para 200 µL de plasma).

As amostras de plasma branco não apresentaram interferência endógena no método de análise dos enantiômeros da bupivacaína (Figura 7). O método desenvolvido não apresenta efeito matriz mesmo na situação de hemólise do plasma (Tabela 3).

O limite de quantificação (LIQ), utilizando alíquotas de 200 µL de plasma no procedimento de extração, foi de 0,25 ng/mL de plasma para ambos os enantiômeros (Tabela 4). O LIQ obtido no presente estudo mostra que o método é mais sensível do que aquele anteriormente reportado por Ribeiro (2012) utilizando 200 µL de plasma (LIQ=5 ng de cada enantiômero/mL), mais sensível que aquele reportado por Papini *et al.* (2004) empregando alíquotas de 1 mL de plasma (LIQ=5 ng de cada enantiômero/mL), assim como mais sensível

que o reportado por Daryanavard *et al.* (2013) empregando a técnica de MIP (polímeros de impressão molecular), como método de extração e utilizando alíquotas de 100 μL de plasma ($\text{LIQ} = 1,445 \text{ ng/mL}$). A maior sensibilidade obtida no presente estudo pode ser explicada em função do emprego do espectrômetro de massas MS/MS XEVO TQS (Waters).

O método mostrou ampla linearidade no intervalo de 0,25 a 500 ng de cada enantiômero/mL de plasma (Tabela 4), mostrando também vantagens em relação ao estudo de Papini *et al.* (2004), com linearidade de 5-100 ng de cada enantiômero/mL de plasma e ao estudo de Ribeiro (2012), 5-500 ng de cada enantiômero/mL de plasma.

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e os erros padrão relativos obtidos nos estudos de exatidão intra e inter-corridas (Tabela 4) 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 dos enantiômeros da bupivacaína em plasma.

Com os estudos de estabilidade de curta duração foi possível constatar que as amostras de plasma nas concentrações alta e baixa são estáveis por 5 h em temperatura ambiente. Já a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento das amostras de plasma nas concentrações alta e baixa dos analitos, mostrou que as amostras são estáveis após três ciclos de congelamento e descongelamento sem relatos de perda ou degradação dos analitos na amostra biológica. A estabilidade pós-processamento nas concentrações alta e baixa, mostrou que os analitos são estáveis no auto-injetor por um período de 16 h. Os resultados dos estudos de estabilidade foram expressos em porcentagem de desvio e não ultrapassaram 15% (Tabela 5).

O método desenvolvido e validado no presente estudo mostrou sensibilidade (LIQ de 0,25 ng de cada enantiômero/mL) compatível para a quantificação dos enantiômeros da bupivacaína em plasma até 14h após a administração de dose única do anestésico de 2,5-22,5 mg via epidural. Dentre as 10 voluntárias investigadas, 3 parturientes foram submetidas ao parto via abdominal (cesárea), recebendo 22,5 mg de cloridrato de bupivacaína racêmica (parturientes 1 e 8) ou 12,5 mg de cloridrato de bupivacaína racêmica (parturiente 6), e 7 foram submetidas ao parto via natural, recendo 2,5 mg de cloridrato de bupivacaína racêmica (parturientes 2, 3, 4, 5, 7, 9 e 10), uma vez que no parto via natural ocorre apenas a analgesia da paciente. Sendo assim, os parâmetros área sob a curva concentração plasmática versus tempo ($\text{AUC}^{0-\infty}$) e concentração plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$), que são ambos dependentes da dose, foram calculados dividindo seus respectivos valores pela dose administrada.

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos para as 10 parturientes investigadas mostram maiores valores de $AUC^{0-\infty}/\text{dose}$, 22,06 (18,24-37,72) vs 21,38 (19,65-43,52) 10^{-6} mL^{-1} ($p < 0,05$) para o enantiômero (S)-(-) em comparação com o (R)-(+)-bupivacaína (Tabela 6), sendo a razão $AUC^{0-\infty}_{(R)/(S)}$ igual a 0,91 (0,82 – 0,99) ($p < 0,05$), indicando um acúmulo plasmático do enantiômero (S)-(-)-bupivacaína. Outro dado que merece destaque é a diferença observada ($p < 0,05$) entre os valores de volume de distribuição aparente dos enantiômeros da bupivacaína nas parturientes investigadas portadoras de HIV em tratamento com ARV (361,9 L para o enantiômero (S)-(-)-bupivacaína e 397,95 L para o enantiômero (R)-(+)-bupivacaína) (Tabela 6). Ressalta-se que no estudo de Papini *et al.* (2004), de investigação de parturientes saudáveis tratadas com cloridrato de bupivacaína racêmica associada com epinefrina, os maior valor de V_{ss}/F também foi para o enantiômero (R)-(+)-bupivacaína, 197,86 vs 169,46 ($p < 0,05$).

Os valores de *clearance* aparente nas parturientes investigadas não diferem significativamente entre os enantiômeros (Tabela 6), sendo de 45,48 (29,32 – 54,87) L/h para o enantiômero (R)-(+)-bupivacaína e de 46,87 (24,94 – 50,91) L/h para o enantiômero (S)-(-)-bupivacaína. Assim como, os valores de meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) da bupivacaína (Tabela 6), com valores de 6,52 (5,72-7,85) h para o enantiômero (R)-(+)-bupivacaína e de 5,77 (4,98-6,69) h para o enantiômero (S)-(-)-bupivacaína.

A avaliação da concentração livre dos enantiômeros da bupivacaína no plasma das parturientes investigadas, exigiu o desenvolvimento e a validação de um método com sensibilidade compatível com as baixas concentrações encontradas no plasma.

O método para a determinação dos enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (S)-(-)-bupivacaína em plasma foi desenvolvido empregando LC-MS/MS e validado de acordo com as recomendações da ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012) para métodos bioanalíticos.

Para a determinação da concentração livre dos enantiômeros da bupivacaína no ultrafiltrado do plasma, utilizou-se amostras das parturientes referentes ao tempo de observação da concentração plasmática máxima ($C_{\max}$). As amostras das pacientes dos referidos tempos foram submetidas ao processo de ultrafiltração para obtenção do ultrafiltrado, e posteriormente essas alíquotas foram extraídas com n-hexano em pH alcalino, como descrito anteriormente, e analisadas por LC-MS/MS nas mesmas condições. Após evaporação da fase orgânica em concentrador a vácuo de amostras, os resíduos foram reconstituídos com 200 μL de fase móvel e volumes de 50 μL foram introduzidos no sistema

cromatográfico para a análise, visando um aumento do sinal analítico, uma vez que as concentrações encontradas são baixas.

O método desenvolvido não apresenta efeito matriz, mesmo utilizando plasma hemolisado e lipêmico na ultrafiltração (tabela 9). O método exigiu alta sensibilidade para a quantificação da fração livre dos enantiômeros da bupivacaína em plasma, já que a ligação às proteínas plasmáticas corresponde a aproximadamente 95%. O LIQ obtido foi de 0,125 ng de cada enantiômero/ mL de plasma, o mais sensível descrito na literatura. O método demonstrou linearidade no intervalo de 0,125 a 10 ng de cada enantiômero/mL de plasma (Tabela 10). Ademais, os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e os erros padrão relativos obtidos nos estudos de exatidão intra e inter-corridas (Tabela 10) foram inferiores a 15%, assegurando a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados.

Os valores de fração livre no plasma (F_u) para os enantiômeros da bupivacaína obtidos de amostras de parturientes portadoras do HIV em tratamento com ARV foram de 9% (6 – 12) para o enantiômero (R)-(+)-bupivacaína e de 6% (4 – 9) para o enantiômero (S)-(-)-bupivacaína ($p < 0,05$). De acordo com os estudos de Veering *et al.* (2002), obtidos de voluntários saudáveis, a fração livre do enantiômero (R)-(+)-bupivacaína foi de $4,6 \pm 1,3 \%$ e do enantiômero (S)-(-)-bupivacaína de $3,1 \pm 0,8 \%$.

O aumento, de aproximadamente 2 vezes, na fração livre de ambos os enantiômeros da bupivacaína pode ser explicado devido à redução na concentração plasmática da alfa-1-glicoproteína ácida, a principal proteína de ligação de anestésicos locais, observada em 7 pacientes, considerando também que as outras 3 pacientes apresentaram valores próximos ao limite inferior do valor de referência. Essa redução está de acordo com dados da literatura de que as concentrações das proteínas plasmáticas podem sofrer modificações durante a infecção pelo HIV e também na gestação. Além disso, o lopinavir e o ritonavir, fármacos administrados nas parturientes para o tratamento da infecção pelo HIV, apresentam alta ligação às proteínas plasmáticas, sendo 98-99 % ligados à albumina e à alfa-1-glicoproteína ácida, valores maiores que para o fármaco de estudo (95%). Sendo assim, pode ocorrer uma saturação dos sítios de ligação das proteínas plasmáticas, deslocando a bupivacaína que é administrada em associação aos ARV (VEERING, *et al.*, 2002; ANDERSON, 2005; GAVARD, *et al.*, 2006; GULATI *et al.*, 2009).

Os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros da bupivacaína nas parturientes investigadas portadoras de HIV em tratamento com ARV foram comparados com o estudo anteriormente reportados por Papini *et al.*; 2004, relativo a disposição cinética dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes saudáveis tratadas com bupivacaína racêmica

por via epidural com associação de epinefrina. Os dados indicados na tabela 12, permitem inferir nas parturientes portadoras de HIV, maiores valores para o *clearance* total aparente, volume de distribuição aparente e meia-vida de eliminação para ambos os enantiômeros da bupivacaína.

Tabela 12: Parâmetros farmacocinéticos referentes ao presente estudo e ao estudo reportado por Papini *et al.*; 2004.

	(R)-(+)-bupivacaína			(S)-(-)-bupivacaína		
	Cl/F	Vss/F	t _{1/2}	Cl/F	Vss/F	t _{1/2}
Presente estudo	45,48	397,95	6,52	46,87	361,90	5,77
Papini et al, 2004	33,15	197,86	4,36	26,39	169,46	4,45

O ritonavir inibe o CYP3A4 intestinal e em baixas concentrações a P-gp. Como a bupivacaína foi administrada por via epidural, e não por via oral, a inibição do CYP3A4 não é relevante. O *clearance* da bupivacaína é intermediário, com influência do fluxo de sangue hepático, da atividade enzimática e da fração livre do fármaco. (GULATI *et al.*, 2009; VAN WATERSCHOOT *et al.*, 2010; HEINE *et al.*, 2011). De acordo com os dados obtidos, os valores de *clearance* aparente de ambos os enantiômeros nas parturientes portadoras do HIV investigadas são maiores do que aqueles reportados por Papini *et al.*, 2004 na investigação de parturientes saudáveis. Dessa forma, o aumento nos valores de Cl/F pode ser explicado em função do aumento da fração livre para ambos enantiômeros da bupivacaína; 9% para o enantiômero (R)-(+)-bupivacaína e de 6% para o enantiômero (S)-(-)-bupivacaína (Tabela 11).

Os valores de volume de distribuição aparente foram aproximadamente 2 vezes maiores para ambos os enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento com ARV, quando comparados com os dados relatados por Papini *et al.*, 2004. O aumento no Vss/F pode ser explicado devido a inibição da P-gp placentária pelo tratamento com ARV, incluindo o ritonavir. A inibição da P-gp placentária favorece a passagem do fármaco através da placenta, conferindo um compartimento a mais para a distribuição dos enantiômeros da bupivacaína (CECKOVA-NOVOTNA, 2006; GULATI *et al.*, 2009; PAL *et al.*, 2011).

A meia vida plasmática é dependente dos valores de volume de distribuição (Vd) e do *clearance* (Cl) do fármaco, de acordo com a equação:

$$t_{1/2} = \frac{0,693 \times Vd}{Cl}$$

De acordo com os dados, o presente estudo apresentou maiores valores de meia-vida de eliminação para ambos os enantiômeros, em comparação com os dados reportados por Papini *et al.*, 2004. De acordo com a equação acima, como o $t_{1/2}$ é dependente do *clearance* e do volume de distribuição, o aumento da meia-vida de eliminação pode ser explicado por um aumento em maior proporção do volume de distribuição em relação ao *clearance*.

Alguns estudos mostram que a taxa de transferência placentária para a bupivacaína em parturientes saudáveis não tratadas com ARV é de aproximadamente 0,33 para o enantiômero (+)-(R) e de 0,31 para o (-)-(S) (DUARTE *et al.*, 2011). No entanto, em pacientes portadoras do HIV em tratamento com os ARV a taxa de transferência placentária dos enantiômeros aumenta respectivamente para 0,58 vs 0,54, de acordo com os dados de Ribeiro (2012).

No presente estudo, a taxa de transferência placentária avaliada nas parturientes investigadas foi de 0,47 (0,40 – 0,54) para o enantiômero (+)-(R)-bupivacaína 0,41 (0,34 – 0,49) para o enantiômero (-)-(S)-bupivacaína. Esses valores demonstram serem maiores que aqueles encontrados para parturientes saudáveis (0,33 vs 0,31), como descrito por Duarte *et al.* (2011), assim como de acordo com os dados reportados por Ribeiro (2012), descritos para parturientes portadoras de HIV em tratamento com ARV (0,58 vs 0,54). O aumento da taxa de transferência placentária para parturientes portadoras do HIV em tratamento com ARV ocorre provavelmente devido à interação dos ARV, incluindo o ritonavir, com a P-gp placentária, promovendo inibição desse transportador e, conseqüentemente, permitindo maiores concentrações dos enantiômeros da bupivacaína no compartimento fetal. Ademais, os valores de taxa de transferência placentária do presente estudo apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), o que infere que a inibição da P-gp placentária é enantiosseletiva, com maior inibição para o enantiômero (+)-(R)-bupivacaína.

Conclusão

6. Conclusões

- Os métodos desenvolvidos e validados para a análise sequencial dos enantiômeros (+)-(R)-bupivacaína e (-)-(S)-bupivacaína como concentração total e como concentração livre em plasma são compatíveis com a aplicação em estudo de farmacocinética em parturientes por apresentar as vantagens do baixo volume de plasma (200 μ L), corrida cromatográfica de aproximadamente 8 minutos, simples procedimento de extração líquido-líquido, baixo LIQ (0,25 ng de cada enantiômero/mL de plasma como concentração total e 0,125 ng de cada enantiômero/mL de plasma como concentração livre), extensa linearidade (0,25-500 ng de cada enantiômero/mL de plasma como concentração total e 0,125 10 ng de cada enantiômero/mL de plasma como concentração livre) e estabilidade assegurada em estudos de curta duração, ciclos de congelamento e pós-congelamento e pós-processamento.
- A farmacocinética da bupivacaína administrada por via epidural a parturientes portadoras do HIV em tratamento com ARV é enantiosseletiva com acúmulo plasmático do enantiômero (S)-(-)-bupivacaína, com razão $AUC_{(R)/(S)}$ igual a 0,91 ($p < 0,05$). A fração livre no plasma (F_u) é maior para o enantiômero (R)-(+)-bupivacaína (9% (6 – 12) quando comparado ao enantiômero (S)-(-)-bupivacaína 6 % (4 – 9) ($p < 0,05$).
- O tratamento com ARV, incluindo o ritonavir, infere interação enantiosseletiva entre os enantiômeros da bupivacaína e a P-gp placentária, com observação de maior inibição para o enantiômero (R)-(+)-bupivacaína.

Referências bibliográficas

7. Referências bibliográficas

ABDULJALIL, K.; FURNESS, P.; JOHNSON, T. N.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; SOLTANI, H. Anatomical, physiological and metabolic changes with gestational age during normal pregnancy: a database for parameters required in physiologically based pharmacokinetic modelling. **Clin Pharmacokinet**, Auckland, v.51, n.6, p.365-96, 2012.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html>. Acesso em: abril/2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 59, de 28 de janeiro de 2003. Dispõe sobre a sub-rede de laboratórios do Programa Nacional de DST e Aids. Disponível em: <<http://pegasus.fmrp.usp.br/projeto/legislacao/Portaria%2059%20de%2028%2001%2003.pdf>>. Acesso em: 01/Jun/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Aids e DST. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/publicacao/2013/boletim-epidemiologico-aids-e-dst-2013>>. Acesso em: abril/2014.

BRUSTUGUN, J.; TROLAND, S.; BREIVIK, H. The stability of a sulphite-free epidural analgesic solution containing fentanyl, bupivacaine, and adrenaline. **Acta Anaesthesiol Scand**. v.57, n.10, p.1321-1327, 2013.

CALZA, L.; MANFREDI, R.; CHIODO, F. Dyslipidaemia associated with antiretroviral therapy in HIV- infected patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, n.1, p.10-14, 2004.

CAMUS, M.; DELIMÉNIE, C.; DIDIER, N.; FAYE, A.; GIL, S.; DAUGE, M.-C.; MABONDZO, A.; FARINOTTI, R. Increased Expression of MDR1 mRNAs and P-glycoprotein in Placentas from HIV-1 Infected Women. **Placenta**, v.27, n.6-7, p.699-706, 2006.

CASARETT, L.J.; DOULL, J.; KLAASEN, C.D. Biotransformation of Xenobiotics. In: **Toxicology the basic science of poisons**. 7 ed. New York McGraw-Hil, 2008, p. 161 – 304.

CECCALDI, P-F.; GAVALD, L.; MANDELROT, L.; REY, E.; FARINOTTI, R.; TRELUYER, J-M.; GIL, S. Functional Role of P-Glycoprotein and Binding Protein Effect on the Placental Transfer of Lopinavir/Ritonavir in the Ex Vivo Human Perfusion Model. **Obstetrics and Gynecology International**, 2009.

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

COLUMB, M.O.; MACLENNAN, K. Local anaesthetic agents. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**. v.8, n.4, p.159-162, 2007

COX, C.R.; FACENDA, K.A.; GILHOOLY, C.; BANNISTER, J.; SCOTT, N.B.; MORRISON, L.M.M. Extradural S(-)-bupivacaine: comparison with racemic RS-bupivacaine. **British Journal of Anaesthesia**, v.80, n.3, p.289-293, 1998.

DARBY, R.A.J; CALLAGHAN, R; MCMAHON, R.M. P-glycoprotein inhibition: the past, the present and the future. **Curr drug metabolism**, Oxford, vol. 12, p. 722-31, 2011.

DAWES, M.; CHOWIENCZK, P. J. Drugs in pregnancy. Pharmacokinetics in pregnancy. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**. v.15, n.6, p.819-826, 2001.

DOSTALEK, M.; AKHLAGHI, F.; PUZANOVOVA M., Effect of Diabetes Mellitus on Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v.51, n.8, p.481-499, 2012.

DUARTE, L. B.; MOISÉS, E. C. D.; CAVALLI, R.; LANCHOTE, V. L.; DUARTE, G.; CUNHA, S. P. Distribution of Bupivacaine Enantiomers and Lidocaine and its Metabolite in the Placental Intervillous Space and in the Different Maternal and Fetal Compartments in Term Pregnancy Women. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v.51, n.2, p. 212-217, 2011.

DUPONT, W.D & PLUMMER, W.D. PS power and sample size program available for free on the Internet. **Controlled Clin. Trials.**, v.18, n.3, p. 274, 1997.

FEGHALI, M. N.; MATTISON, D. R. Clinical Therapeutics in Pregnancy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v.2011, 13 pages, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation Research. Guidance for Industry, Pharmacokinetics in Pregnancy - Study Design, Data Analysis, and Impact on Dosing and Labeling. Rockville, Maryland: Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services, October 2004: 1-14. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM072133.pdf>>. Acesso em abril de 2014.

GABRIELSSON, J.; WEINER, D. Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: concepts & Applications. 3rd edition. Stockholm, Sweden: Apotekarsocieteten, 2000. 924 p.

GANTENBEIN, M.; ATTOLINI, L.; BRUGUEROLLE, B.; VILLARD, P-H.; PUYOOU, F.; DURAND, A.; LACARELLE, B.; HARDWIGSEN, J.; LE-TREUT, Y-P. Oxidative Metabolism of Bupivacaine into Pipecolylxydine in Humans Is Mainly Catalyzed by CYP3A4. **Drug Metabolism and Disposition**, v.28, n.4, p.383-385, 2000.

GAOHUA, L.; ABDULJALIL, K.; JAMEI, M.; JOHNSON, T.N.; HODJEGAN, A.R. A pregnancy physiologically-based pharmacokinetic (p-PBPK) model for disposition of drugs metabolized by CYP1A2, CYP3A4 and CYP2D6. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.74, n.5, p. 873-885, 2012.

GAVARD, L.; GIL, S; PEYTAVIN, G.; CECCALDI, P-F.; FERREIRA, C.; FARINOTTI, R.; MANDELBROT, L. Placental transfer of lopinavir/ritonavir in the ex vivo human cotyledon perfusion model. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.195, n.1, p.296-301, 2006.

GROTTO, R. M. T.; PARDINI, M. I. M. C. Biologia Molecular do HIV-1 e genética da resistência humana à AIDS. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v.13, n.3, p.61-64, 2006.

GULATI, A.; GERK, P. M. Role of Placental ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters in Antiretroviral Therapy During Pregnancy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.98, n.7, p.2317-2335, 2009.

HEINE, R.T.; VAN WATERSCHOOT, R. A. B.; KEIZER, R. J.; BEIJNEN, J. H.; SCHINKEL, A. H.; HUITEMA, A., D., R. An Integrated Pharmacokinetic Model for the Influence of CYP3A4 Expression on the *In Vivo* Disposition of Lopinavir and Its Modulation by Ritonavir. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.100, n.6, p.2508-2515, 2011.

IQBAL, M.; AUDETTE, M. C.; PETROPOULOS, S.; GIBB, W.; MATTHEWS, S. G. Placental drug transporters and their role in fetal protection. **Placenta**, v. 33, n. 3, p. 137-142, 2012.

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*. v.41, n.2, p.256-262, 2013

KILLIAN, M. S.; LEVY, J. A. HIV/AIDS: 30 years of progress and future challenges. **European Journal of Immunology**, v.41, p.3401-3411, 2011.

KLASSE, P. J. The molecular basis of HIV entry. **Cellular Microbiology**, v.14, n.8, p.1183-1192, 2012.

KNOPPERT, D. Safety and efficacy of drugs in pregnancy. **J Popul Ther Clin Pharmacol**, Toronto, v.18, n.3, p.506-12, 2011.

MAHY, M.; STOVER, J.; KIRAGU, K.; HAYASHI, C.; AKWARA, P.; LUO, C.; STANECKI, K.; EKPINI, R.; SHAFFER, N. What Will it take to achieve virtual elimination of mother-to-child transmission of HIV? An assessment of current progress and future needs. **Sexually Transmitted Infections**, v.86, n.2, p.48-55, 2010.

MARGOLIS, A., M.; HEVERLING, H.; PHAM, P. A.; STOLBACH, A. A Review of the Toxicity of HIV Medications. **Journal of Medical Toxicology**, v.10, n.1, p.26-39, 2014.

MARTÍN, P.; ENRIQUE, N.; PALOMO, A. R. R.; REBOLLEDO, A.; MILESI, V. Bupivacaine inhibits large conductance, voltage- and Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human umbilical artery smooth muscle cells. **Channels**, v.6, n.3, p. 174-180, 2012.

MILLIPORE CORPORATION. Assay of free anticonvulsant drugs, Application note, AN1002EN00. Disponível em: <<http://www.millipore.com/publications>>. Acesso em 27/Julho/2012.

MILLIPORE CORPORATION. Centrifree® Ultrafiltration Devices, User guide. Disponível em: <<http://www.millipore.com/techlibrary>>. Acesso em 15/Dez/2011

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. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

MYLLYNEN, P.; PASANEN, M.; VÄHÄKANGAS, K. The fate and effects of xenobiotics in human placenta. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, London, v. 3, n. 3, p. 331-46, 2007.

NEWELL, M-L.; BUNDERS, M. J. Safety of antiretroviral drugs in pregnancy and breastfeeding for mother and child. **Current Opinion HIV AIDS**, v.8, n.5, p. 504-510, 2013.

MYLLYNEN, P.; VÄHÄKANGAS, K. Placental transfer and metabolism: An overview of the experimental models utilizing human placental tissue. **Toxicology in Vitro**, v.27, n.1, p. 507-512, 2013.

PAL, D.; KWATRA, D.; MINOCHA, M.; PATURI, D. K.; BUDDA, B.; MITRA, A. K. Efflux transporters – and cytochrome P-450-mediated interactions between drugs of abuse and antiretrovirals. **Life Sciences**, v.88, n.21-22, p.959-971, 2012.

PAPINI, O.; MATHES, A. C. S.; CUNHA, S. P.; LANCHOTE, V. L. Stereoselectivity in the Placental Transfer and Kinetic Disposition of Racemic Bupivacaine Administered to Parturients With or Without a Vasoconstrictor. **Chirality Journal**, v.16, n.2, p.65-71, 2004.

PINTO NETO, L.F. S.; NEVES, M. B.; RODRIGUES, R. R.; PAGE, K.; MIRANDA, A. E. Dyslipidemia and fasting glucose impairment among HIV patients three years after the first antiretroviral regimen in a Brazilian AIDS outpatient clinic. **Braz J Infect Dis**. v. 17, n. 4, p. 438-443, 2013.

RIBEIRO, R. M. P. Influência dos Antiretrovirais Zidovudina, Lamivudina, Lopinavir e Ritonavir na Transferência Placentária e na Distribuição no Líquido Amniótico dos Enantiômeros da Bupivacaína em Humanos. 2012. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

RUBINCHIK-STERN, M.; EYAL, S. Drug interactions at the human placenta: what is the evidence? **Front. Pharmacol.**, v. 3, n. 126, p. 1-7, 2012.

SCOTT, D.A.; EMANUELSSON, B-M.; MOONEY, P.H.; COOK R.J.; JUNESTRAND, C. Pharmacokinetics and efficacy of long-term epidural ropivacaine infusion for postoperative analgesia. **Anesthesia and Analgesia**, v.85, n.6, p.1322-1330, 1997.

SIDEBOTHAM, D.A.; SCHUG S.A. Stereochemistry in anaesthesia. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.24, n.2, p.126-130, 1997.

STANLEY, T. L.; GRINSPOON, S. K. Body Composition and Metabolic Changes in HIV-Infected Patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v.205, n.3, p.383-390, 2012.

SOUZA, S. J.; LUZIA, L. A.; SANTOS, S. S.; RONDÓ, P. H. C. Lipid profile of HIV-infected patients in relation to antiretroviral therapy: a review. **Rev Assoc Med Bras.** v. 59, n.2, p.186–198, 2013.

TRACY, T.S.; VENKATARAMANAN, R.; GLOVER, D.D. et al. Temporal changes in drug metabolism (CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A activity) during pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, New York, v.192, n.2, p. 633-9, 2005.

VALENZUELA, C.; MORENO, C.; LA CRUZ, A. DE; MACÍAS, A.; PRIETO, A.; GONZÁLEZ, T. Stereoselective Interactions between Local Anesthetics and Ion Channels. **Chirality**, v.24, n.11, p. 944-950, 2012.

VAN WATERSCHOOT, R.; HEINE, R. T.; WAGENAAR, E.; VAN DER KRUIJSSEN, C. M. M.; ROOSWINKEL, R. W.; HUITEMA, A. D. R.; BEIJNEN, J. H.; SCHINKEL, A. H. Effect of cytochrome P450 3A (CYP3A) and the drug transporters P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) and MRP2 (ABCC2) on pharmacokinetics of lopinavir. *British Journal of pharmacology*, v. 160, n.5, p.1224-1233, 2010

VARMA, M.V.; ASHOKRAJ, Y.; DEY, C.S.; PANCHAGNULA, R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. **Farmacological Research**, v.48, n.4, p.347-359, 2003.

VEERING, B.T.; BURM, A.G.L.; FEYEN, H-M.; OLIEMAN, W.; SOUVERIJIN, J.H.M., VAN KEEF, J.W. Pharmacokinetics of Bupivacaine during Postoperative Epidural Infusion: enantioselectivity and role of protein binding. **Anesthesiology**, v.96, n.5, p.1062-1069, 2002.

VOLBERDING, P. The impact of anemia on quality of life in human immunodeficiency virus-infected patients. **J Infect Diseases**. San Franscisco, vol. 185, p. S110-4, Suplemento 2, 2002.

WU, Y-T.; KAO, Y-L.; LIN, L-C.; TSAI, T-H. Effects of a P-Glycoprotein modulador on the pharmacokinetics and distribution of free levobupivacaine and bupivacaine in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v.396, n.1-2, p. 127-133, 2010.

ZHOU, S. F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. **Xenobiotica**, v. 38, n. 7-8, p. 802-832, 2008.

Apêndices

8. Apêndices

APÊNDICE A – Características individuais das pacientes investigadas e dos recém-nascidos

Tabela I – Características das pacientes portadoras do HIV (n=10)

Pacientes	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	IG (semanas(s) e dias(d))
1	35	93,9	1,64	34,91	41s e 6d
2	35	74,1	1,67	26,56	39s e 3d
3	35	55,8	1,55	23,25	40s e 3d
4	26	88,2	1,55	36,75	39s e 1d
5	19	40,6	1,52	15,6	37s e 2d
6	35	110	1,58	44	38s
7	28	62,8	1,56	26,17	41s e 5d
8	19	75,3	1,60	29,41	39s e 6d
9	33	85,6	1,64	31,7	41s
10	22	76,3	1,68	27,25	38s e 3d

IMC: Índice de Massa Corporal, calculado como a razão entre o peso e a altura ao quadrado; IG: Idade Gestacional, dado em semanas (s) e dias (d).

Tabela II – Características dos recém-nascidos (n=10)

Pacientes	Peso do recém-nascido (g)	Estatura (cm)	Peso da placenta (g)
1	2745	48,0	580
2	2830	47,0	500
3	2390	45,0	490
4	3475	51,0	725
5	2355	45,5	430
6	2915	47,5	620
7	2070	41,0	435
8	2180	43,0	450
9	2230	45,0	520
10	2450	47,0	480

APÊNDICE B – Parâmetros bioquímicos

Tabela III: Dados individuais dos parâmetros bioquímicos das pacientes investigadas

Variáveis Estudadas	Pacientes									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Uréia (10-50 md/dL)	17	15	16	19	11	23	18	19	20	18
Creatinina plasmática (0,7-1,5 mg/dL)	0,66	0,59	0,67	0,73	0,48	0,69	0,69	0,69	0,7	0,66
Bilirrubina (Total 0,2-1,2 mg/dL)	0,29	0,36	0,32	0,74	0,19	0,26	0,31	0,20	0,19	0,33
(Direta até 0,3 mg/dL)	0,10	0,11	0,10	0,14	0,06	0,08	0,09	0,05	0,09	0,5
(Indireta até 0,9 mg/dL)	0,19	0,25	0,22	0,59	0,13	0,19	0,22	0,15	0,1	0,28
TGP/ALT (até 31U/L)	10,2	16	10,9	9	5,3	13,8	10,7	10	11	12
TGO/AST (até 32U/L)	12,3	17	17,2	16	13,1	22,4	17,3	12,1	14	15
Albumina (3,5-4,8 g/dL)	3,8	-	3,8	4	-	3,7	3,9	3,6	3,7	3,9
Glicemia (70 -100 mg/dL)	86	85	77	-	69	64	79	80	81	79
GTT 75g (≥92/180/153 mg/dL)	89/ 151/ 122	87/ 103/ 109	82/ 152/ 115	75/ 103/ 102	70/ 73/ 69	73/ 206/ 70	85/ 150/ 111	90/ 111/ 120	90/ 110/ 116	76/ 111/ 123
Gama-GT (11-50 U/L)	14	89	15	90	-	14	17	12	13	15
Alfa 1-glicoproteína ácida (50-120 mg/dL)	56,70	38	39	36	42	48	37	57,2	57	49
Fosfatase alcalina (65-300 U/L)	147	402	390	354	170	171	393	400	380	169
Proteínas totais (6- 8,5 g/dL)	6,7	-	6,1	7,2	-	7,1	6,13	6,5	6,6	6,7

Colesterol Total (< 200mg/dL)	179	240	202	233	244	215	200	177	225	230
HDL (> 35 mg/dL)	38	42	62	47	58	71	60	35	34	59
LDL (< 130 mg/dL)	82	-	108	-	152	103	110	81	80	109
Triglicerides (< 150mg/dL)	296	545	162	144	169	207	165	295	293	301
Na+ (135 – 145 mEq/L)	139,1	136,1	139,5	141,8	139,6	132,4	137,1	140,2	142	138,3
K+ (3,5 – 5 mEq/L)	4,3	4,4	4,3	4,5	4,1	5,8	4,1	4,3	4,1	4,2

- dado não disponível

APÊNDICE C – Exames laboratoriais para a avaliação da normalidade do sistema hematológico.

Tabela IV: Dados individuais da avaliação da normalidade funcional do sistema hematológico das pacientes investigadas

Parâmetros	Pacientes									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glóbulos vermelhos (3,9 a 5 10⁶/uL)	3,73	3,69	3,58	3,91	3,23	3,72	3,60	3,75	3,93	3,25
Hemoglobina (12 a 15,5 g/dL)	11,1	11,6	11,4	12,5	11	13,1	11,6	11,3	10,9	13
Hematócrito (35 a 45 %)	34	35	34	36	33	40	35	36	38	35
Glóbulos Brancos (3500 a 10500 10³/uL)	7600	7900	6400	10100	5900	10700	6600	7800	9900	6100
Neutrófilos (1700 a 8000 10³/uL)	4800	5100	3700	7900	3800	6000	3900	5000	7700	4000
Linfócitos (900-2900 10³/uL)	2000	2000	1600	1900	1500	4000	1800	2200	1700	1700
Plaquetas (150 a 450 10³/uL)	305	145	249	239	163	306	251	307	237	166

APÊNDICE C – Dados individuais da disposição cinética dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento com antirretrovirais tratadas com dose única de bupivacaína racêmica.

Tabela V: Dados individuais da disposição cinética do enantiômero (R)-(+)-bupivacaína em pacientes portadoras do HIV em tratamento com ARV (n=10).

Pacientes	AUC^{0-∞}/dose (h.ng/mL.mg)	Cmax/dose (ng/mL.mg)	t_{1/2} (h)	Cl (L/h)	V_{ss} (L)
1	24,09	2,79	5,99	41,5	358,8
2	41,95	3,01	9,66	23,84	332,26
3	10,17	1,19	5,93	98,34	841,96
4	39,6	3,89	7,06	25,26	275,19
5	15,2	1,93	5,45	65,78	517,05
6	21,97	1,93	7,87	45,82	517,09
7	17,88	2,34	5,31	55,92	428,1
8	22,15	2,72	5,65	45,15	367,8
9	42,66	3,8	7,79	23,44	263,52
10	19,33	1,62	8,28	51,73	617,65

Tabela VI: Dados individuais da disposição cinética do enantiômetro (S)-(-)-bupivacaína em pacientes portadoras do HIV em tratamento com ARV (n=10).

Pacientes	AUC ^{0-∞} /dose (h.ng/mL.mg)	Cmax/dose (ng/mL.mg)	t _{1/2} (h)	Cl (L/h)	V _{ss} (L)	AUC ^{0-∞} (R) / (S)
1	20,45	2,9	4,88	48,91	344,74	1,18
2	52,19	3,05	11,87	19,16	327,98	0,8
3	12,23	1,52	5,55	81,79	655,05	0,83
4	49,54	5,3	6,47	20,18	188,5	0,8
5	16,39	2,416	4,7	61	413,59	0,93
6	25,48	2,21	7,98	39,24	451,75	0,86
7	20,12	2,64	5,29	49,7	379,07	0,89
8	22,31	3,32	4,66	44,83	301,44	0,99
9	52,2	6,03	6	19,16	165,86	0,82
10	19,49	2	6,77	51,31	501,27	0,99

APÊNDICE D – Dados individuais da fração livre (Fu) dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento com antirretrovirais tratadas com dose única de bupivacaína racêmica.

Tabela VII– Fração livre no plasma (Fu) para os enantiômeros (R)-(+)-bupivacaína e (R)-(+)-bupivacaína

Parturiente	(R)-(+)- bupivacaína	(S)-(-)-bupivacaína
1	0,111	0,075
2	0,136	0,076
3	0,108	0,063
4	0,064	0,038
5	0,07	0,056
6	0,071	0,042
7	0,072	0,046
8	0,165	0,157
9	0,042	0,027
10	0,089	0,053

Anexos

9. Anexos

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do HCFMRP - USP

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

Ribeirão Preto, 29 de agosto de 2013

Ofício nº 3171/2013
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“INFLUÊNCIA DO DIABETES MELLITUS NA FARMACOCINÉTICA DOS ENANTIÔMEROS DA BUPIVACAÍNA EM PARTURIENTES PORTADORAS DO HIV EM TRATAMENTO COM ANTIRRETROVIRAIS” – versão 3, de 19/08/2013**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 372ª Reunião Ordinária realizada em 26/08/2013 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – versão 3, de 19/08/2013**, de acordo com o Processo HCRP nº 9050/2013.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

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

Ilustríssimos Senhores
PROF.DR. GERALDO DUARTE
MARÍLIA CRISTINA OLIVEIRA SOUZA
Depto. de Ginecologia e Obstetria

Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP n 5440
(16) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do FCFRP - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 25 de abril de 2014.

Projeto de pesquisa: “Influência do *diabetes mellitus* na farmacocinética dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento com antirretrovirais”

Pesquisador Responsável: Geraldo Duarte

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

“O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 446/12. Diante disso, a FCFRP-USP, como instituição coparticipante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas corresponsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos da pesquisa, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar”.

Ciente e de acordo:

PROF. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

Prof.ª Dr.ª Maria Vitória Lopes Badur Bentley
Diretora

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO*****PESQUISA CIENTÍFICA*****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

NOME DO VOLUNTÁRIO / IDADE: _____ / _____
REGISTRO E/OU DOCUMENTO DE IDENTIFICAÇÃO: _____

NOME DA PESQUISA: **“Influência do *diabetes mellitus* na farmacocinética dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento com antirretrovirais”.**

PESQUISADORES:

Mestranda: Marília Cristina Oliveira Souza - (16) 9-8190-9434

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote - (16) 3602-4195

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

Convido você a participar do estudo: *“Influência do diabetes mellitus na farmacocinética dos enantiômeros da bupivacaína em parturientes portadoras do HIV em tratamento com antirretrovirais”.*

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

Sabe-se que a AIDS, os remédios usados no tratamento da AIDS e o diabetes podem produzir alterações no organismo e modificar o efeito, tanto na mãe quanto no recém-nascido, dos medicamentos usados na anestesia para o parto cesáreo. Para sabermos se o diabetes altera a eliminação da bupivacaína, um anestésico muito utilizado durante a anestesia para realização da cesárea, nas mães com AIDS e nos seus recém-nascidos, iremos comparar no momento do parto um grupo de mulheres com AIDS sem diabetes com um grupo de mulheres com AIDS e diabetes. A pesquisa será realizada no momento do parto e ocorrerá antes e após a administração da anestesia epidural. Antes de iniciar a pesquisa 3 tubos de sangue de 10 mL cada um (cerca de duas colheres de sopa) será coletado da veia do seu braço para verificar se as funções do seu fígado e dos seus rins estão normais. Ao ser internada para realização do parto, nós iremos coletar uma amostra de sangue da veia do seu braço, e após a administração do anestésico para realização da cesárea, nós iremos coletar mais 13 amostras de 10 mL (cerca de duas colheres de chá) de sangue cada um da veia do seu braço, em tempos diferentes, 1, 5, 15, 30, 45 e 60 minutos e em 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14h, com auxílio de seringa. Um tubinho de plástico será colocado na sua veia, assim nós iremos picar você uma única vez. No momento do seu parto nós iremos coletar uma amostra de sangue da veia do seu braço e do cordão umbilical para verificar a passagem do anestésico pela placenta. A coleta do sangue do cordão umbilical ocorrerá somente depois do nascimento do bebê e do clampeamento (interromper) e secção

do cordão umbilical, sem oferecer risco para seu (sua) filho (a). Ainda, dentro da sala de parto e após o nascimento do bebê, em uma superfície sem contaminação, serão coletadas amostras do tecido placentário e do cordão umbilical. Os inconvenientes dessa pesquisa serão a picada da agulha para colher sangue e a internação durante 14 horas. A pesquisa não interferirá na conduta clínica a ser conduzida no caso da senhora e não ocasionará nenhum risco adicional à senhora e ao seu (sua) filho (a). A sua colaboração vai aumentar o nosso conhecimento de como os anestésicos usados antes da cesárea são eliminados pelo corpo e poderá ajudar na escolha e no ajuste da dosagem para a senhora e para outras parturientes com problemas de saúde semelhantes ao seu.

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 garantia de receber do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEP HCFMRP), pelo telefone (16) 3602-2228, a resposta a qualquer dúvida ética acerca da pesquisa;
3. 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;
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
5. Os pesquisadores se comprometem a manter sigilo da sua participação e de publicar os resultados da pesquisa para a comunidade médica e científica pertinente;
6. A garantia de receber uma via desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente assinada pelo (a) pesquisador (a).
7. 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: Marília Cristina Oliveira Souza
CPF: 097.566.866-85