



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



**Desenvolvimento e validação de método de análise de nifedipino em fluidos
biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência**

Bruno Borsari

Araraquara-SP
2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Desenvolvimento e validação de método de análise de nifedipino em fluidos biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do grau de Farmacêutico Bioquímico.

Orientadora: Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes

Araraquara-SP

2017

BRUNO BORSARI

**Desenvolvimento e validação de método de análise de nifedipino em fluidos
biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência**

Data da aprovação: 11/12/2017

Orientador: Prof^a. Dr^a. Natalia Valadares de Moraes

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à meus pais,
por todo apoio e confiança...*

*À meu irmão, pelos conselhos e preocupação
que sempre teve comigo...*

*A minha namorada Renata, pela confiança e
por sempre estar ao meu lado...*

*Ao meu grande amigo João Paulo, pelos conselhos
e confiança...*

*Aos meus amigos Gabriel e Caio, que moraram comigo
durante 5 anos e compartilharam momentos inesquecíveis...*

*Ao meu avô Aphidan e Antônio, por serem exemplos
de ética, competência e humildade...*

*Aos meus amigos e colegas de faculdade,
por estarem comigo dia após dia nessa caminhada...*

*Aos professores da FCFAR, pela paciência, confiança
e pela incrível dedicação...*

*Aos amigos e colegas do laboratório de toxicologia e
de toxicologia ocupacional, por todos os ensinamentos e confiança.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes pela confiança, por me dar oportunidade de trabalhar ao seu lado e por todos os ensinamentos e conquistas que obtive graças a ela.

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia e Toxicologia Ocupacional, por todos os ensinamentos, conversas e apoio que me deram.

Aos amigos Mariana, Bianca, Priscila e Jhohann por toda a paciência, humildade e por todo o conhecimento que me passaram.

À todos os professores, técnicos e demais funcionários da FCF-UNESP, por terem se tornados além de exemplos profissionais, mas também grandes amigos, pelos quais sempre terei um carinho e confiança muito grande.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

- Figura 1 – Fórmula estrutural do nifedipino: uma diidropiridina com um substituinte aromático na posição 4.....pág 13.
- Figura 2 – Procedimento de extração líquido-líquido de nifedipino em plasma humano.....pág 17.
- Figura 3 – Procedimento de extração em fase sólida de nifedipino em leite materno humano.....pág 19.
- Figura 4 – Cromatogramas referentes à extração de nifedipino em plasma humano. O cromatograma (A) refere-se ao plasma branco e o cromatograma (B) ao plasma enriquecido com nifedipino na concentração de 100 ng/mL (1) e padrão interno (2).....pág 25.
- Figura 5 – (A) Curva analítica do método de análise de nifedipino em plasma humano no intervalo de concentrações de 10 a 150 ng/mL de plasma. (B) Plote da porcentagem de erro relação à concentração do método de análise de nifedipino em plasma humano por CLAE-UV.....pág 26.
- Figura 6 – Cromatogramas referentes à extração de nifedipino em leite materno humano. O cromatograma (A) refere-se ao leite branco e o cromatograma (B) ao leite enriquecido com nifedipino na concentração de 100 ng/mL (2) e padrão interno (1).....pág 30.
- Figura 7 – (A) Curva analítica do método de análise de nifedipino em leite humano no intervalo de concentrações de 5 a 100 ng/mL de leite. (B) Plote da porcentagem de erro relação à concentração do método de análise de nifedipino em leite materno por CLAE-UV.....pág 32.

LISTA DE TABELAS:

- Tabela 1 – Limites de confiança do método de análise de nifedipino em plasma humano por LC-UV.....pág 28.
- Tabela 2 – Limites de confiança do método de análise de nifedipino em leite materno por LC-UV.....pág 33.
- Tabela 3 – Concentração de nifedipino no plasma e leite maternos nas pacientes investigadas no estudo (n=15).....pág 34.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS:

ABC – *ATP-binding cassette transporters*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BCRP – *breast cancer resistance protein*

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CLUE - cromatografia líquida de ultra eficiência

CQA – controle de qualidade de alta concentração

CQB – controle de qualidade de baixa concentração

CV – coeficiente de variação

EPR – erro padrão relativo

FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

HCFMRP – Hospital Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HPLC - *high performance liquid chromatography*

LIQ – limite inferior de quantificação

LLE – *liquid-liquid extraction*

LSQ – limite superior de quantificação

MAE - *microwave assisted extraction*

MASE - *membrane-assisted solvent extraction*

MSPD - *matrix solid Phase dispersion*

PA – pressão arterial

PI – padrão interno

PLE - *pressurized liquid extraction*

QuEChERS - *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*

SBSE – *stir bar sorptive extraction*

SFE - *supercritical fluid extraction*

SPE – *solid phase extraction*

SPME – *solid phase micro extraction*

UNESP – Universidade Estadual Paulista

UPLC - *ultra performance liquid chromatography*

USP – Universidade de São Paulo

UV – ultravioleta

WHO – *World Health Organization*

RESUMO

O nifedipino é um antihipertensivo do tipo bloqueador de canal de cálcio aceito para o uso durante a gestação e lactação. Estudos demonstram que o nifedipino é transferida para o leite materno através dos processos de difusão passiva e transporte ativo mediado por ABCG2/BCRP. Métodos cromatográficos para a investigação dos fatores que influenciam na transferência de nifedipino para o leite materno são necessários e até a presente data não há descrição de método de análise de nifedipino em leite materno. O objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar métodos de análise de nifedipino em amostras de plasma e leite materno humanos por cromatografia líquida de alta eficiência. As concentrações plasmáticas de nifedipino foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV). O método de análise de nifedipino por CLAE-UV mostrou linearidade no intervalo de 10 a 150 ng/mL para o plasma e 5 a 100 ng/mL para o leite materno. A sensibilidade do método se mostrou compatível com a aplicação desejada com limites de quantificação de 10 ng/mL e 5 ng/mL para o plasma e leite materno, respectivamente. A precisão, avaliada pelo coeficiente de variação, e a exatidão, avaliada pelo erro padrão relativo, foram inferiores a 15%. Os métodos validados foram aplicados para a investigação da transferência de nifedipino para o leite materno em lactantes hipertensas tratadas com comprimidos de liberação controlada na dose de 20 mg a cada 12 horas atendidas no Ambulatório de Gestação de Alto Risco da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Palavras-chave: Nifedipino. Plasma. Leite materno. Lactantes. CLAE

ABSTRACT

Nifedipine is an antihypertensive of the calcium channel blocker type accepted for use during gestation and lactation. Studies have shown that nifedipine is transferred into breast milk through passive diffusion and active transport mediated by ABCG2 / BCRP. Chromatographic methods for an investigation of the factors influencing the transfer of nifedipine to breast milk are necessary and to this moment there is no description of the method of analysis of nifedipine in breast milk. The objective of the present study was to develop and validate methods of nifedipine analysis in human plasma and human milk samples by high performance liquid chromatography. Plasma concentrations of nifedipine were assessed by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV). The method of analysis of nifedipine by HPLC-UV showed linearity in the range of 10 to 150 ng/mL for plasma and 5 to 100 ng/mL for breast milk. The sensitivity of the method was compatible with a desired application with quantification limits of 10 ng/mL and 5 ng/mL for plasma and breast milk, respectively. The precision, evaluated by coefficient of variation, and the accuracy, evaluated by the relative error, was lower than 15%. The methods were used to investigate the transfer of nifedipine to breast milk in hypertensive lactants treated with controlled release tablets at a dose of 20 mg every 12 hours attended at the High Risk Pregnancy Outpatient Clinic of Ribeirão Preto Medical School, Univesity of São Paulo.

Keywords: Nifedipine. Plasma. Breast milk. Lactants. HPLC

SUMÁRIO

1 Introdução	10
1.1 Determinação de fármacos em amostras biológicas	10
1.2 Nifedipino	12
2 Objetivos	15
3 Metodologia	15
3.1 Reagentes	15
3.2 Análise de nifedipino em plasma e leite materno por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta	15
3.2.1 Condições cromatográficas.....	15
3.2.2 Preparo das soluções padrão	16
3.2.2.1 Plasma	16
3.2.2.2 Leite materno	16
3.2.3 Processamento da amostra	16
3.2.3.1 Plasma	17
3.2.3.2 Leite materno	18
3.2.4. Validação	20
3.2.4.1 Seletividade	20
3.2.4.2 Efeito residual	20
3.2.4.3 Linearidade	21
3.2.4.4 Precisão e exatidão	21
3.2.4.5 Recuperação.....	22
3.2.4.6 Estabilidade	22
3.2.4.6.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.....	23
3.2.4.6.2 Estabilidade de curta duração.....	23
3.2.4.6.3 Estabilidade de pós processamento	23
3.2.4.6.4 Estabilidade de longa duração.....	23
4 Resultados e Discussão	24
4.1 Análise de nifedipino em plasma.....	24
4.2 Análise de nifedipino em leite materno	29
4.3 Aplicação do metodo.....	34
5 Conclusão	34
6 Referências Bibliográficas	35

1 INTRODUÇÃO

Este Trabalho de Concussão de Curso foi realizado com o intuito de desenvolver métodos de análise de nifedipino no plasma e no leite materno por técnicas cromatográficas. Os métodos desenvolvidos e validados neste estudo serão aplicados pelo grupo de pesquisa na investigação dos fatores que interferem na transferência de nifedipino para o leite materno, como por exemplo, na avaliação da influência de polimorfismos genéticos de ABCG2/BCRP na transferência do fármaco para o leite.

1.1 Determinação de fármacos em amostras biológicas

Constam na literatura diversos métodos de análise de nifedipino em plasma, seja usando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (GRUNDY et al., 1994; JANKOWSKI et al., 1994; NIOPAS et al., 2003; YRITIA et al., 2000; ZENDELOVSKA et al., 2006), por espectrometria de massas (FILGUEIRA et al., 2015; GUO et al., 2007; MARTENS et al., 1994; PATEL et al., 2012) ou ainda métodos que usam a cromatografia gasosa (JANKOWSKI et al., 1994; MARTENS et al., 1994). Por outro lado até a presente data, não foi encontrado nenhum trabalho científico relatando método de análise de nifedipino em leite materno.

Desde o seu surgimento, a cromatografia gasosa tornou-se uma técnica muito importante na Química Analítica, sendo uma de suas grandes vantagens o poder de separação (DANDENAU et al., 1979). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é muito eficaz na separação de compostos não voláteis e termicamente instáveis, motivo que contribui para que a partir da década de 1990, a CLAE superasse a cromatografia gasosa, tornando-se a ferramenta mais utilizada nas Ciências Farmacêuticas (LEHOTAY et al., 2002; SNYDER et al., 2010).

Mais recentemente, os sistemas CLUE (Cromatografia de Ultra Performance) também conhecidos como UHPLC (sigla em inglês para *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*), demonstraram muitas vantagens quando comparados a CLAE como análises mais rápidas (em até 5 minutos), melhor resolução com picos mais estreitos, e aumento substancial em detectabilidade (aumento da relação sinal-ruído) (LEANDRO et al., 2006). Por outro lado, a tecnologia de CLAE tradicional não é projetada para trabalhar nas altas pressões necessárias para as análises por CLUE e nova tecnologia requer instrumentos que

possam operar em pressões de até 15000 psi (MALDANER et al., 2009; ISMAIL et al., 2016).

A complexidade das matrizes biológicas como o plasma humano ou o leite materno podem gerar dificuldades para o desenvolvimento de métodos analíticos, uma vez que é necessária a realização de etapa de preparo de amostra também chamada de etapa de limpeza (*clean up*) para reduzir os interferentes da matriz e minimizar a manutenção das colunas e do sistema cromatográfico (OLIVEIRA et al., 2008; SNYDER et al., 2010).

O plasma humano é constituído de aproximadamente 7 a 8% de proteínas, sendo que a albumina corresponde a 55% do total de proteínas, além de α_1 -glicoproteína ácida, lipoproteínas, imunoglobulinas, entre outras. Além da fração proteica, outras substâncias encontradas no plasma são eletrólitos, lipídeos, hormônios e metabólitos, cujas concentrações estão sujeitas a variações fisiológicas e/ou patológicas (OLIVEIRA et al., 2008).

O leite materno é constituído por água (88%), proteínas (3%), lipídeos (aproximadamente 3%) e carboidratos na forma de lactose (6,8%). O colostro que aparece no início da lactação difere significativamente do leite habitual, pois contém menos lactose e praticamente não contém lipídeos. A composição do leite humano é constante a partir da terceira semana após o nascimento do bebê, contudo a composição do colostro pode variar muito a partir do início da lactação até a terceira semana (OLIVEIRA et al., 2008).

No desenvolvimento de métodos analíticos, o preparo das amostras pode se dar por várias técnicas, sendo que as mais frequentemente empregadas para amostras biológicas são a precipitação de proteínas, a extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*, LLE), extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE), e técnicas que envolvem o uso de membranas. Variações das técnicas supracitadas podem ser também utilizadas como a micro-extração em fase sólida (*Solid Phase MicroExtraction*, SPME), a micro-extração em fase líquida (*Liquid-Phase MicroExtraction*, LPME), extração sortiva em barra magnética (*Stir Bar Sorptive Extraction*, SBSE), QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) (Prestes et al., 2011; SNYDER et al., 2010) entre outras.

A preparação de amostras foi por algum tempo uma etapa analítica negligenciada, visto que ao longo dos anos recebeu muito menos atenção e pesquisa do que as etapas de separação cromatográfica e detecção. Entretanto, a

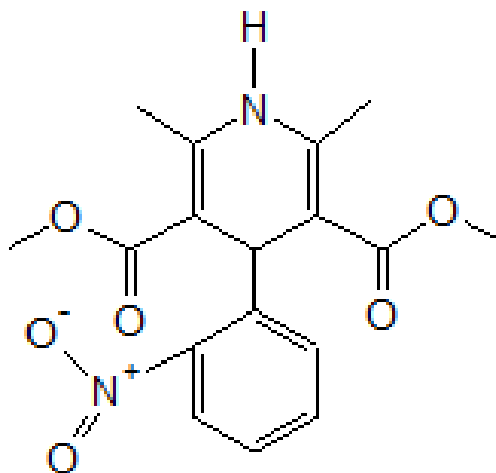
partir dos anos 80, por conta das preocupações ambientais e de saúde, tem-se tentado evitar ao máximo o uso de solventes prejudiciais e o processo de extração por fase sólida tem sido uma boa alternativa (HERCEGOVÁ et al., 2007).

Em geral, as propriedades desejadas para o preparo de amostra em análises cromatográficas são: a) recuperação (ou eficiência da extração) reprodutível nos diferentes níveis de concentração do analito de interesse; b) remoção suficiente dos interferentes da amostra para aumentar a seletividade e evitar efeitos de matriz indesejáveis; c) aumento da concentração dos analitos e, portanto, da sensibilidade do ensaio; d) baixo custos; e) rápida e de fácil execução; h) segurança que pode se dar em função do pequeno volume de solventes utilizados ou uso de solventes de menor toxicidade (SNYDER et al., 2010).

1.2 Nifedipino

O nifedipino (2,6-diamino-4-(piperidina-1-il)3,5-dimetil-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-1,4-diidropiridina-3,5-dicarboxilato), protótipo do grupo das diidropiridinas, é um bloqueador dos canais de Ca^{2+} usado no tratamento da hipertensão, insuficiência cardíaca e arritmia cardíaca (Figura 1). Seu mecanismo de ação se dá por inibição do influxo de íons de cálcio pela membrana das células da musculatura lisa de vasos e do coração, sem alterar as concentrações de cálcio no soro. Possui ação vasodilatadora das artérias coronarianas e é um dos principais medicamentos utilizados para o tratamento de gestantes hipertensas crônicas em função da sua atividade inibidora da liberação do hormônio antidiurético e redução da resistência vascular sistêmica (SOUSA et al., 2006; GARBACZ et al., 2009; PODYMOW & AUGUST, 2011; GIANNUBILO et al., 2012; BRUNTON, 2012).

Figura 1 – Fórmula estrutural do nifedipino: uma diidropiridina com um substituinte aromático na posição 4.



Fonte: GUO et al. (2007)

A farmacocinética do nifedipino é caracterizada por grande variabilidade individual, principalmente com relação às concentrações plasmáticas (EHRENKRANZ, et al., 1989; MANNINEN & JUHAKOSKI, 1991; SOONS et al., 1992.). O início da ação do nifedipino após administração oral de comprimidos de liberação normal é de 20 minutos e após administração sublingual é de 1-5 minutos (PAPATSONIS et al., 2001; KATZUNG, 2012). Sua meia-vida varia de 1,3 h para cápsulas administradas por via oral a 15,2 h após a administração oral de comprimidos de liberação controlada. O nifedipino é absorvida principalmente a partir do jejuno e sua biodisponibilidade oral varia de 45 a 70% (KATZUNG, 2012) em função do metabolismo pré-sistêmico não linear (SCHELLENS et al., 1991; ABOU-AUDA et al., 2000).

O nifedipino é biotransformado principalmente pela isoforma 3A4 do citocromo P450 (CYP3A4) com formação dos metabólitos polares e inativos de hidronifedipino (M-0), 2,6-dimetil-4-(-nitrofenil)-5-metoxycarbonil-piridina-3-carboxílico (M-I) e o correspondente ácido 2-hidroximetil-piridinocarboxílico (M-II). Cerca de 70 a 80% desses metabólitos são excretados pelos rins e o restante é excretado nas fezes (ABOU-AUDA et al., 2000; PAPATSONIS et al., 2001).

O nifedipino é de natureza lipofílica e por isso as concentrações do fármaco no sangue e no leite materno são relativamente altas (GHANEM & MOVAHED, 2008). A transferência de nifedipino para o leite materno é de 9,33 representada pela razão de concentração no leite / plasma (razão L/P) (GHANEM & MOVAHED, 2008).

De acordo com a *American Academy of Pediatrics* (2001) o nifedipino é compatível com a amamentação. Em seu livro, Dr. Hale a classificou como L2, indicando que o fármaco foi estudado em um pequeno número de lactantes sem observação de efeitos adversos no lactente ou evidência remota de risco na lactação (HALE, 2008).

Fundamentalmente todos os fármacos podem ser excretados para o leite humano, sendo que, para a maioria deles o transporte ocorre por difusão passiva. A exposição de lactentes a fármacos presentes no leite materno dependerá essencialmente dos seguintes fatores: peso molecular, biodisponibilidade oral do fármaco no trato gastrointestinal do lactente, concentração no plasma materno, lipossolubilidade, grau de ionização e afinidade às proteínas plasmáticas (COSTA & DOMICIANO, 2008; ROWE et al., 2013).

Ensaio realizados em células de alta expressão de ABCG2/BCRP identificaram as 1,4 dihidropiridinas, nicardipina e nifedipino, como substratos de ABCG2/BCRP. O envolvimento de transportadores na transferência de fármacos do sangue para o leite materno foi inicialmente descrito por Jonker e colaboradores (JONKER et al., 2005). O transportador ABCG2/BCRP, membro da família dos transportadores do tipo ABC (*ATP-binding cassette transporters*), foi inicialmente descrito como fator de resistência de células de câncer de mama para o tratamento com adriamicina e, portanto, recebeu o nome de proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP, da sigla em inglês para *Breast Cancer Resistance Protein*). Tratam-se de transportadores presentes nas células do epitélio alveolar da glândula mamária cuja expressão aumenta significativamente durante a lactação (Figura 2) (JONKER et al., 2005; FROMM e KIM, 2004). Relata-se na literatura que por ser substrato do transportador, o nifedipino apresenta potencial risco de exposição aos lactentes decorrente da excreção e acúmulo de nifedipino no leite materno (SHUKLA et al., 2006).

Tendo em vista a importância de métodos cromatográficos para a investigação dos fatores que influenciam na transferência de nifedipino para o leite materno, o presente trabalho de conclusão de curso teve o intuito de desenvolver e

validar métodos de análise de nifedipino em diferentes matrizes biológicas. O método foi aplicado para a determinação da concentração de nifedipino no plasma e leite colhido de lactantes hipertensas em uso de nifedipino de liberação controlada na dose de 20 mg a cada 12 horas atendidas no Ambulatório de Gestação de Alto Risco da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). A etapa clínica deste trabalho foi realizada pela mestrandia do grupo de pesquisa Bianca Nayra Malfará sob coordenação clínica dos Professores Geraldo Duarte e Ricardo Cavalli Carvalho da FMRP-USP.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar métodos bioanalíticos para a determinação das concentrações de nifedipino em plasma e leite materno por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV.

3. METODOLOGIA

3.1 Reagentes

O padrão nifedipino foi adquirido da Sigma Aldrich (98%, St Lous, MO, EUA). Os solventes metanol e éter dietílico são grau CLAE e os reagentes hidróxido de sódio (Synth, Diadema, Brasil), fosfato de potássio monobásico (Synth, Diadema, Brasil) e hidrogenofosfato dissódico (Synth, Diadema, Brasil) são grau analítico. Toda a água utilizada durante o experimento foi obtida em sistema de purificação Milli-Q[®] Plus (Millipore, Belford, MA, EUA).

3.2 Análise de nifedipino em plasma e leite materno por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta

3.2.1. Condições cromatográficas

A análise de nifedipino no plasma e no leite materno foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV), utilizando cromatógrafo Perkin Elmer, composto de um sistema quarternário de bombas Flexar LC Pump e detector Flexar UV/VIS, operando no comprimento de onda de 238 nm.

Foi utilizada a coluna LiChrospher® 100 RP-18 capeada (5 µm, 125×4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) e fase móvel constituída por mistura de tampão fosfato 0,020 mol/L (pH 4,8):metanol na proporção 40:60 (v/v) para a análise em plasma e na proporção 35:65 (v/v) para a análise em leite materno na vazão de 1 mL/min.

As análises foram realizadas em sala com o auxílio de luz amarela e todas as amostras foram mantidas em condições de proteção da luz em função da fotossensibilidade do nifedipino (MARTENS et al., 1994).

3.2.2. *Preparo das soluções padrão*

3.2.2.1. *Plasma*

A solução padrão estoque nifedipino foi preparada na concentração de 1 mg/mL em metanol. A partir dessa solução foram realizadas sucessivas diluições para obtenção das soluções de uso nas concentrações 200, 500, 1000, 1500, 2000 e 3000 ng/mL de metanol. O padrão interno diazepam foi preparado na concentração de 1 mg/mL em metanol e posteriormente diluído na concentração de 1500 ng/mL em metanol.

3.2.2.2. *Leite Materno*

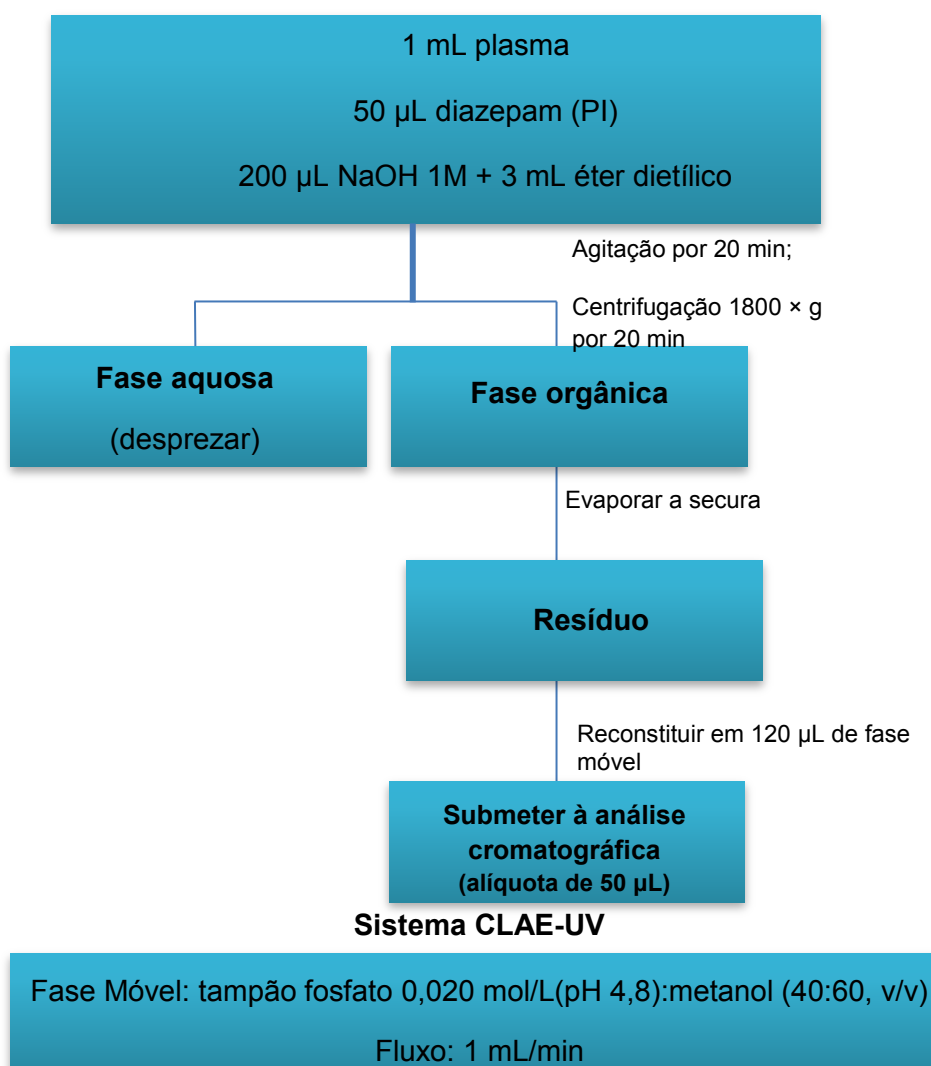
A solução estoque do padrão de nifedipino foi preparada na concentração de 1 mg/mL em metanol. A partir dessa solução foram realizadas sucessivas diluições para obtenção das soluções de uso nas concentrações 200, 400, 1000, 2000, 3000 e 4000 ng/mL de metanol. A solução estoque de fenacetina (padrão interno) foi preparada na concentração de 1 mg/mL em metanol e posteriormente diluída na concentração de 50 µg/mL em metanol.

3.2.3. *Processamento da amostra*

3.2.3.1. Plasma

Alíquotas de 1 mL de plasma foram enriquecidas com 50 μ L da solução contendo padrão interno (diazepam, 1500 ng/mL em metanol), 200 μ L de solução de hidróxido de sódio 0,1 M e após agitação em vortex por dez segundos, foram adicionados 3 mL do solvente extrator (éter dietílico). As amostras foram agitadas durante vinte minutos em mesa agitadora recíprocante (TE-240 Tecnal, 130 ± 10 ciclos/min), centrifugadas por dez minutos à $2000 \times g$. A fase orgânica (2 mL) de cada amostra foi transferida para microtubos de 2 mL e evaporada à secura em sistema de banho seco a 40°C . O resíduo foi reconstituído em 120 μ L da fase móvel e 50 μ L foram submetidos à análise cromatográfica (Figura 2).

Figura 2 – Procedimento de extração líquido-líquido de nifedipino em plasma humano.

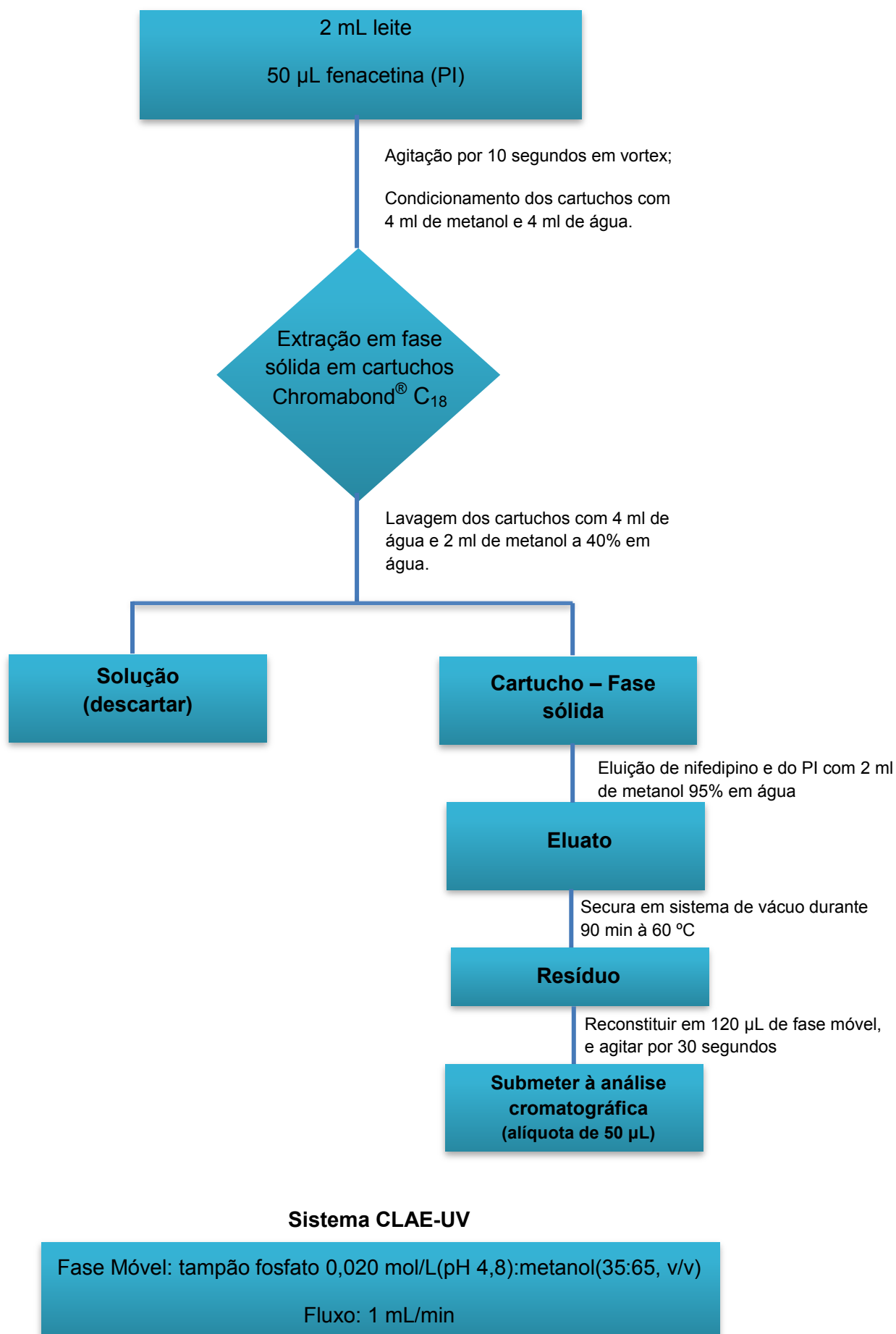


PI: padrão interno; CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência por detecção em ultravioleta

3.2.3.2. *Leite materno*

Alíquotas de 2 mL de leite materno foram enriquecidas com 50 µL da solução contendo padrão interno (fenacetina, 50 µg/mL em metanol) e agitadas em vortex por dez segundos. Após o condicionamento dos cartuchos com 4 mL de metanol e 4 mL de água, as amostras foram submetidas à extração em fase sólida em cartuchos Chromabond® C₁₈ (500 mg, 3 mL). A lavagem das amostras foi feita com 4 mL de água e 2 mL de metanol a 40% em água. Subsequentemente o nifedipino e o padrão interno foram eluídos utilizando 2 mL de metanol a 95% em água. Logo após o eluato foi seco em um sistema de vácuo durante 90 min à 60 °C. Todo o processo de extração em fase sólida foi realizado sob vácuo a 30 psi (Figura 3).

Figura 3 – Procedimento de extração em fase sólida de nifedipino em leite materno humano.



3.2.4. Validação

O processo de validação atendeu as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a validação de métodos bioanalíticos (BRASIL, 2012). O objetivo desses procedimentos foi avaliar se os métodos bioanalíticos poderiam ser aplicados na quantificação de nifedipino em plasma e leite materno de lactantes hipertensas. Conforme recomendação da legislação vigente, os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, efeito residual, linearidade, precisão e exatidão intra e interensaios e estabilidade de nifedipino em plasma e leite materno em temperatura ambiente (curta duração), após ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento e longa duração.

3.2.4.1. Seletividade

Seletividade é a capacidade do método de analisar o analito e o padrão interno na presença dos componentes endógenos comuns a matriz biológica de interesse. Para a avaliação da seletividade do método em plasma foram utilizadas amostras de plasma branco obtidas de oito fontes distintas, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas. Para a avaliação da seletividade do método bioanalítico em leite materno foram utilizadas amostras de 6 fontes distintas. Para que um método seja considerado seletivo, respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito e respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do padrão interno (PI) inferiores a 5% da resposta do PI quando amostras branco são comparadas às amostras do limite inferior de quantificação (LIQ).

3.2.4.2. Efeito Residual

O ensaio de efeito residual objetiva avaliar se há contaminações residuais entre duas injeções cromatográficas subsequentes. Este ensaio foi avaliado através de três injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de amostra processada no limite superior de quantificação (LSQ). As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% e as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI inferiores a 5% quando comparados à amostra processada do LIQ.

3.2.4.3. *Linearidade*

A curva analítica para avaliação de linearidade foi construída a partir da razão das áreas do pico do analito/PI e pela concentração nominal do analito. Foram construídas e avaliadas três curvas analíticas incluindo a análise da amostra branco, da amostra zero e seis mostras de diferentes concentrações do padrão adicionadas de PI. Para a aceitação da curva foram utilizados os critérios definidos pela Resolução RDC n° 27, 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012). A linearidade do método foi dada através da utilização da regressão linear ordinária.

Para o método utilizando do plasma humano, alíquotas de 1 mL de plasma branco enriquecidas com 50 µL da solução padrão foram utilizadas. As amostras foram extraídas e analisadas como descrito anteriormente (itens 3.2.3.1 e 3.2.1). Foram construídas e avaliadas três curvas de calibração com concentrações finais de 10, 25, 50, 75, 100 e 150 ng/mL de nifedipino em plasma.

Para o método em leite materno humano, alíquotas de 2 mL de leite branco enriquecidas com 50 µL da solução padrão foram utilizadas. As amostras foram extraídas e analisadas conforme descrição nos itens 3.2.3.2 e 3.2.1. Foram construídas e avaliadas três curvas de calibração concentrações finais de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 ng/mL de nifedipino em leite materno.

3.2.4.4. *Precisão e exatidão*

A precisão e exatidão do método foram avaliadas em uma mesma corrida (intra-ensaios) e em três corridas diferentes (inter-ensaios). Os controles de qualidade limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de média concentração (CQM), controle de qualidade de alta concentração (CQA) e controle de qualidade de diluição (CQD) foram analisados em 5 replicatas. A precisão é adequada quando o coeficiente de variação (CV) não for superior a 15%, exceto para a menor concentração, para a qual é aceitável o CV de até 20%. O CV foi determinado conforme a Equação 1

$$CV = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração m dia experimental}} \quad (1)$$

A exatidão intra-ensaios e inter-ensaios foi determinada através do cálculo do erro padrão relativo (EPR), o qual deve apresentar valores inferiores a $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual se admitem valores inferiores a $\pm 20\%$ do valor nominal. O EPR é calculado conforme a equação 2.

$$EPR = \frac{(\text{Concentração m dia experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}} \quad (2)$$

3.2.4.5. *Recuperação*

Para determinar a eficiência do procedimento de extração (ou recuperação) foram comparadas áreas de padrões não extraídos aqueles extraídos da matriz biológica (plasma ou leite materno) na mesma concentração, de acordo com a equação 3.

$$R\% = \frac{\text{Patr o extra do}}{\text{Patr o n o extra do}} \times 100 \quad (3)$$

3.2.4.6. *Estabilidade*

A estabilidade do nifedipino foi analisada usando amostras de CQB e CQA analisadas em triplicada. A concentração das amostras foi determinada por curva analítica recém-preparada. A estabilidade é demonstrada quando a média das concentrações obtidas em relação ao valor nominal não apresentar desvio superior a 15%. A estabilidade do analito na matriz biológica foi demonstrada por meio dos estudos de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração, estabilidade de longa duração e estabilidade pós-processamento.

3.2.4.6.1. *Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento*

Amostras CQB e CQA foram utilizadas para avaliar a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento. As amostras foram congeladas à -20°C e mantidas por 24 horas. Na sequência, as amostras foram descongeladas até atingirem temperatura ambiente. Após atingirem a temperatura ambiente, as mesmas foram congeladas novamente sob as mesmas condições anteriores. Esse procedimento foi repetido por três ciclos e após o último ciclo de congelamento e descongelamento as amostras foram analisadas.

3.2.4.6.2. *Estabilidade de curta duração*

No estudo de estabilidade de curta duração, as amostras foram processadas e analisadas após permanecerem a temperatura ambiente por tempo superior ao utilizado durante o estudo. Para este estudo as amostras permaneceram por 6 horas em temperatura ambiente e então foram processadas e analisadas.

3.2.4.6.3. *Estabilidade de pós-processamento*

As amostras dos controles de qualidade de baixa e alta concentração foram submetidas às mesmas condições de análises utilizadas no estudo, porém por período superior à duração da corrida analítica. Neste estudo, antes de realizar a análise, as amostras processadas foram mantidas dentro do autoinjeter por um período de 24 horas à temperatura de 18 °C.

3.2.4.6.4. *Estabilidade de longa duração*

As amostras dos controles de qualidade de baixa e alta foram armazenadas por um período superior ao intervalo de tempo entre a coleta das amostras e a análise. Para esse teste os controles de qualidade foram mantidos por três meses à temperatura de -20 °C e então analisados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

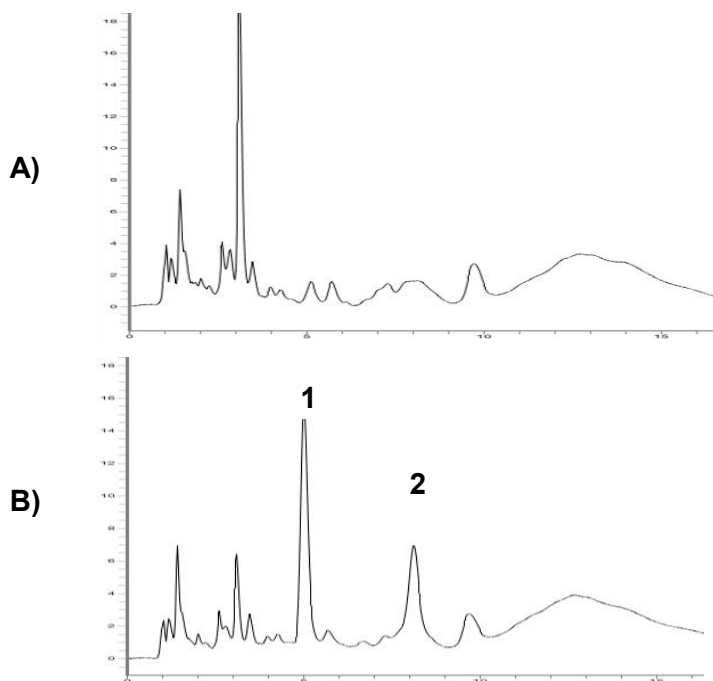
4.1 Análise de nifedipino em plasma

No presente estudo, foi desenvolvido um método de análise de nifedipino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta. O comprimento de onda de 238 nm foi selecionado com base em trabalhos descritos na literatura (JANKOWSKI & LAMPARCZYK, 1994; NIOPAS & DAFTSIOS, 2003). Foi utilizada a coluna em fase reversa LiChrospher[®] 100 RP-18 capeada (5 µm, 125×4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) e fase móvel constituída por mistura de tampão fosfato 0,020 mol/L (pH 4,8):metanol (40:60, v/v) na vazão de 1 mL/min.

O diazepam foi empregado como padrão interno em função do fator de retenção próximo ao do analito de interesse; por estar bem resolvido do mesmo nas condições cromatográficas selecionadas; e por ser extraído em éter dietílico em meio básico. O uso da fase móvel tampão fosfato 0,020 mol/L pH 4,8:metanol (40:60, v/v) resultou na observação do tempo de retenção de 5,6 minutos para nifedipino e 8,6 minutos para o padrão interno.

As amostras de plasma foram preparadas por extração líquido-líquido usando éter dietílico como solvente extrator. Outros trabalhos cujo preparo de amostra se deu por extração líquido-líquido utilizaram os solventes diclorometano:n-pentano (30:70) (FILGUEIRA et al., 2015), acetato de etila (AHMED, 2010), hexano:éter terc-metil-butílico (25:75) (ZENDELOVSKA et al., 2006). As misturas de solventes extratores diclorometano:n-pentano (30:70), hexano:éter terc-metil-butílico (25:75) e acetato de etila foram testadas, porém resultaram em recuperação de nifedipino inferior aquela observada usando o éter dietílico. A Figura 4 corresponde aos cromatogramas da extração em plasma branco e plasma enriquecido com nifedipino na concentração de 100 ng/mL de plasma e padrão interno (diazepam) empregando a coluna LiChrospher[®] 100 RP-18 capeada (5 µm, 125×4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) e fase móvel constituída por tampão fosfato 0,020 mol/L (pH 4,8): metanol (40:60, v/v) na vazão de 1 mL/min.

Figura 4 – Cromatogramas referentes à extração de nifedipino em plasma humano. O cromatograma (A) refere-se ao plasma branco e o cromatograma (B) ao plasma enriquecido com nifedipino na concentração de 100 ng/mL (1) e padrão interno (2).

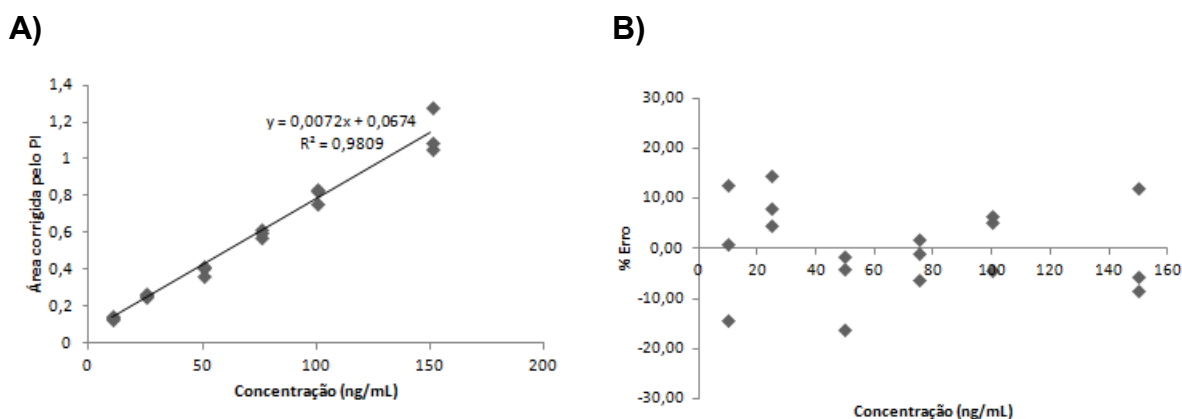


Condições cromatográficas: Coluna em fase reversa LiChrospher® 100 RP-18 capeada (5 μ m, 125 $\times$ 4 mm, Merck); Fase móvel: tampão fosfato 0,020mol/L (pH 4,8):metanol (40:60, v/v), na vazão de 1 mL/min; λ = 238 nm.

O método para análise de nifedipino em plasma de humanos foi validado conforme as recomendações da resolução RDC N° 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA (BRASIL, 2012). Foram avaliados os parâmetros seletividade, efeito residual, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão intra e interensaios e estabilidade em matriz biológica.

A linearidade do método de análise de nifedipino em plasma humano foi avaliada através da análise de três curvas analíticas, incluindo a análise da amostra branco (sem analito e sem padrão interno) e da amostra zero (apenas padrão interno). As curvas foram construídas utilizando alíquotas de 1 mL de plasma branco enriquecidas com 50 μ L de solução padrão de cada solução padrão de uso de nifedipino, resultando nas concentrações finais de 10, 25, 50, 75, 100 e 150 ng/mL de plasma. As amostras foram extraídas e analisadas conforme o item 3.2.3.1 e 3.2.1. Foi observada linearidade na faixa de concentrações de 10 a 150 ng/mL com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9809 e % de erro inferiores a 15 % (Figura 5 e Tabela 1).

Figura 5 – (A) Curva analítica do método de análise de nifedipino em plasma humano no intervalo de concentrações de 10 a 150 ng/mL de plasma. (B) Plote da porcentagem de erro em relação à concentração do método de análise de nifedipino em plasma humano por CLAE-UV.



Condições cromatográficas: Coluna em fase reversa LiChrospher® 100 RP-18 capeada (5 µm, 125×4 mm, Merck); Fase móvel: tampão fosfato 0,020mol/L (pH 4,8):metanol (40:60, v/v), na vazão de 1 mL/min; $\lambda = 238$ nm.

Para avaliação da seletividade, os testes foram realizados usando amostras de plasma obtidas de 8 fontes distintas, sendo 4 normais, 2 lipêmica e 2 hemolisada. O método foi considerado seletivo, pois no tempo de retenção do nifedipino e do padrão interno não foram encontrados picos interferentes com área superior a 20% e 5% respectivamente quando comparados ao LIQ.

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi definido como a menor concentração analisada (10 ng/mL) a qual apresentou coeficiente de variação e erro padrão relativo inferiores a 20%. O LIQ de 10 ng/mL apresentou precisão intra e interensaios e exatidão intra e interensaios com coeficientes de variação e erro padrão relativo inferiores a 15%, respectivamente. O LIQ deste método foi similar ao de estudos publicados na literatura que usaram CLAE com detecção por ultravioleta, considerando o volume de amostra de 1 mL de plasma (JANKOWSKI e LAMPARCZYK, 1994; GRUNDY et al., 1994; NIOPAS et al., 2003). O uso da espectrometria de massas implica em maior detectabilidade com observação de LIQ de até 0,05 ng/mL a partir do uso de 0,2 mL de plasma (MARTENS et al., 1994; GUO et al., 2007; PATEL et al., 2012; FILGUEIRA et al., 2015). Entretanto, esse detector é encontrado em poucos laboratórios e o seu elevado custo de aquisição e manutenção são ainda limitantes do seu uso em mais laboratórios de pesquisa.

A precisão e exatidão foram determinadas em uma mesma corrida (intraensaio) e em três corridas diferentes (interensaio) através da análise em quintuplicatas dos controles de qualidade LIQ (10 ng/mL), CQB (25 ng/mL), CQM (75 ng/mL), CQA (120 ng/mL) e CQD (300 ng/mL). A precisão intracorrída e intercorrída foi avaliada através do coeficiente de variação com base em todos os valores obtidos, o qual não apresentou valores superiores a 15%, incluindo o LIQ, para o qual é aceitável CV de até 20% (Tabela 1). A exatidão intraensaio e interensaio foi determinada através do erro padrão relativo (EPR) o qual apresentou valores inferiores a $\pm 15\%$ do valor nominal para todas as concentrações analisadas. Os resultados obtidos mostram que o método é preciso e exato.

A estabilidade foi demonstrada após ciclos de congelamento e descongelamento, estudo de curta duração e pós-processamento. Amostras dos controles de qualidade CQB (25 ng/mL) e CQA (120 ng/mL) foram preparadas e analisadas em triplicata e uma curva analítica recém preparada foi utilizada para determinar a concentração das amostras. A estabilidade foi demonstrada, pois a média das concentrações obtidas em relação ao valor nominal não apresentou desvio superior a 15% (Tabela 1).

Tabela 1 – Limites de confiança do método de análise de nifedipino em plasma humano por LC-UV.

Nifedipino	
Linearidade (10 – 150 ng/mL)	0,0072x + 0,0674
r^2	0,9809
Precisão Interensaios (CV%, n=15)	
LIQ (10 ng/mL)	14,9
CQB (25 ng/mL)	12,1
CQM (75 ng/mL)	13,4
CQA (120 ng/mL)	8,0
CQD (300 ng/mL)	13,0
Precisão Intra-ensaio (CV%, n=5)	
LIQ (10 ng/mL)	13,1
CQB (25 ng/mL)	10,5
CQM (75 ng/mL)	7,8
CQA (120 ng/mL)	1,5
CQD (300 ng/mL)	7,5
Exatidão Interensaios (EPR%, n=15)	
LIQ (10 ng/mL)	-7,9
CQB (25 ng/mL)	-7,1
CQM (75 ng/mL)	0,3
CQA (120 ng/mL)	-6,3
CQD (300 ng/mL)	4,6
Exatidão Intra-ensaio (EPR%, n=5)	
LIQ (10 ng/mL)	-14,4
CQB (25 ng/mL)	-3,3
CQM (75 ng/mL)	11,6
CQA (120 ng/mL)	1,7
CQD (300 ng/mL)	14,6
Estabilidade (EPR%, n=3)	
<i>Curta Duração</i> (6h à 23°C)	
CQB (25 ng/mL)	-5,6
CQA (120 ng/mL)	0,7
<i>Pós-processamento</i> (24h à 18°C)	
CQB (25 ng/mL)	-5,1
CQA (120 ng/mL)	-5,5
<i>Congelamento/descongelação</i> (3 ciclos)	
CQB (25 ng/mL)	-7,6
CQA (120 ng/mL)	-5,8
<i>Longa Duração</i> (90 dias à -20°C)	
CQB (25 ng/mL)	-0,2
CQA (120 ng/mL)	1,1

CV = coeficiente de variação [(desvio padrão/média) × 100]; r = coeficiente de correlação linear, %
 Inexatidão = [(concentração obtida – concentração real)/concentração real] × 100; LIQ: limite de quantificação; 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.

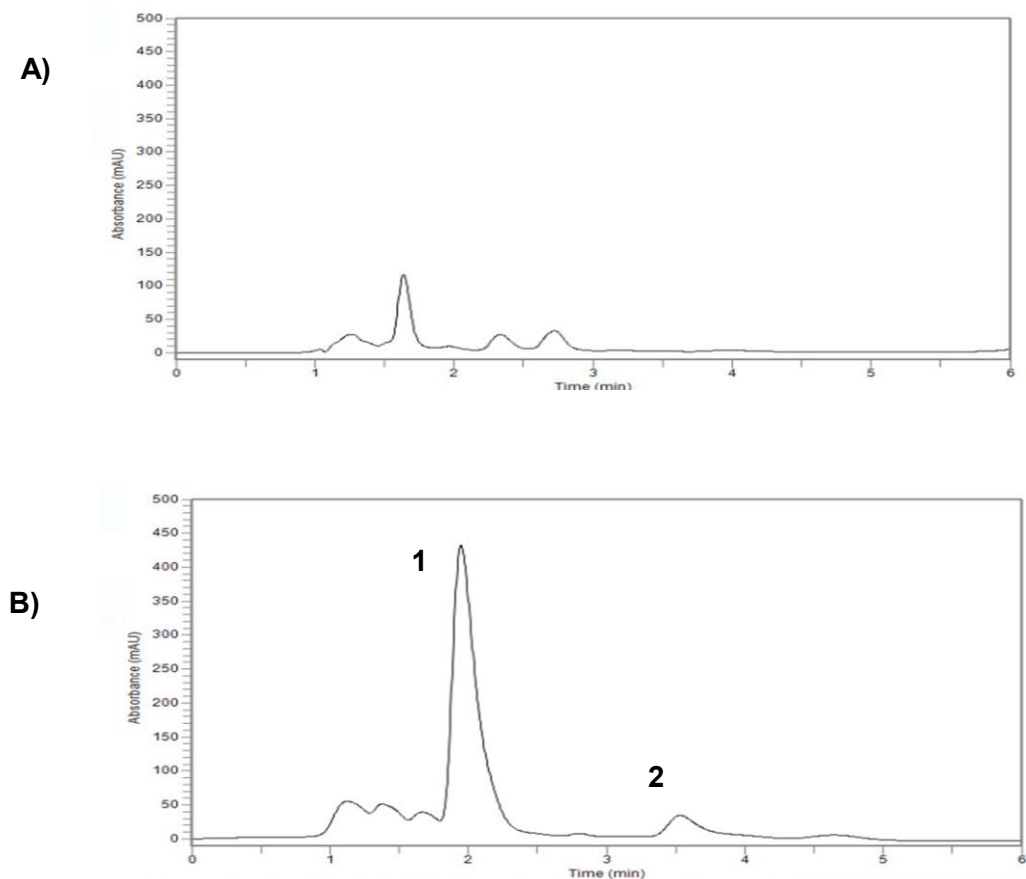
4.2 Análise de nifedipino em leite materno

Até a presente data, não há disponível na literatura, descrição de método de determinação de nifedipino em leite materno. A fenacetina foi empregada como padrão interno em função do fator de retenção próximo ao do analito de interesse; por estar bem resolvido do mesmo nas condições cromatográficas selecionadas. O uso da fase móvel tampão fosfato 0,020 mol/L pH 4,8: metanol (35:65, v/v) resultou na observação do tempo de retenção de 3,6 minutos para nifedipino e 2 minutos para o padrão interno.

O preparo da amostra na análise de nifedipino em leite materno foi realizado por extração em fase sólida. A Figura 6 corresponde aos cromatogramas da extração em leite branco e leite enriquecido com nifedipino na concentração de 100 ng/mL de leite e padrão interno (fenacetina) empregando a coluna LiChrospher® 100 RP-18 capeada (5 µm, 125×4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) e fase móvel constituída por tampão fosfato 0,020 mol/L (pH 4,8): metanol (35:65, v/v) na vazão de 1 mL/min. Os cromatogramas do leite branco mostram ausência de picos interferentes no tempo de retenção do nifedipino e do padrão interno.

A gordura extraída de certas matrizes como o leite materno, pode afetar negativamente a precisão e a exatidão do método cromatográfico. Além disso, os lipídios não possuem uma boa solubilidade em acetonitrila, um dos solventes mais usados na cromatografia em fase líquida. A gordura proveniente da matriz biológica que pode ser co-extraída durante o preparo da amostra e deve idealmente ser removida antes da análise cromatográfica. O uso de cartuchos C18 em extração de fase sólida demonstram remoção efetiva de gorduras na etapa de preparo de amostras (HERCEGOVÁ et al., 2007; SNYDER et al., 2010).

Figura 6 – Cromatogramas referentes à extração de nifedipino em leite materno humano. O cromatograma (A) refere-se ao leite branco e o cromatograma (B) ao leite enriquecido com nifedipino na concentração de 100 ng/mL (2) e padrão interno (1).



Condições cromatográficas: Coluna em fase reversa LiChrospher® 100 RP-18 capeada (5 μ m, 125×4 mm, Merck); Fase móvel: tampão fosfato 0,020mol/L (pH 4,8):metanol (35:65, v/v), na vazão de 1 mL/min; λ = 238 nm.

O método para análise de nifedipino em leite materno humano foi validado conforme as recomendações da resolução RDC N° 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA (BRASIL, 2012). Foram avaliados os parâmetros seletividade, efeito residual, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão intra e interensaios e estabilidade em matriz biológica.

Apesar dos relatos de transferência de nifedipino para o leite materno encontrados na literatura (PENNY e LEWIS, 1989; EHRENKRANZ et al., 1989; MANNINEN e JUHAKOSKI, 1991), não foi encontrado na literatura nenhum trabalho científico descrevendo método de análise de nifedipino no leite materno seja por técnicas cromatográficas ou outras técnicas analíticas. Portanto, o presente trabalho apresenta pela primeira vez método de análise de nifedipino no leite materno com

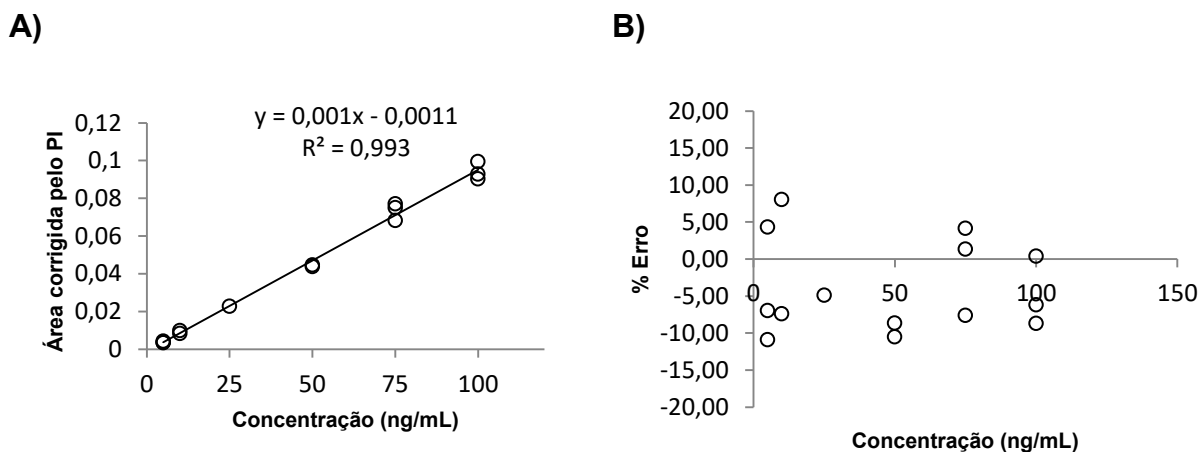
parâmetros de validação compatíveis com a determinação do fármaco em amostras de leite materno colhidas de lactantes tratadas com doses múltiplas do fármaco.

A linearidade do método de análise de nifedipino em leite humano foi avaliada através da análise de três curvas analíticas, incluindo a análise da amostra branco (sem analito e padrão interno) e da amostra zero (apenas padrão interno). As curvas foram construídas utilizando alíquotas de 2 mL de leite branco enriquecidas com 50 µL de solução padrão de cada solução padrão de uso de nifedipino, resultando nas concentrações finais de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 ng/mL de leite. As amostras foram extraídas e analisadas conforme o item 3.2.3.2 e 3.2.1. Foi observada linearidade na faixa de concentrações de 5 a 100 ng/mL com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9938 e % de erro inferiores a 15 % (Figura 7).

O método foi considerado seletivo, pois no tempo de retenção do nifedipino e do padrão interno não foram encontrados picos interferentes com área superior a 20% e 5% respectivamente quando comparados ao LIQ.

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi definido como a menor concentração analisada (5 ng/mL) a qual apresentou coeficiente de variação e erro padrão relativo inferiores a 20%. O LIQ de 5 ng/mL apresentou precisão intra e interensaios e exatidão intra e interensaios com coeficientes de variação e erro padrão relativo inferiores a 15%, respectivamente.

Figura 7 – (A) Curva analítica do método de análise de nifedipino em leite humano no intervalo de concentrações de 5 a 100 ng/mL de leite. (B) Plote da porcentagem de erro relação à concentração do método de análise de nifedipino em leite materno por CLAE-UV.



Condições cromatográficas: Coluna em fase reversa LiChrospher® 100 RP-18 capeada (5 µm, 125×4 mm, Merck); Fase móvel: tampão fosfato 0,020mol/L (pH 4,8):metanol (35:65, v/v), na vazão de 1 mL/min; $\lambda = 238$ nm.

A precisão e exatidão foram determinadas em uma mesma corrida (intraensaios) e em três corridas diferentes (interensaios) através da análise em quintuplicatas dos controles de qualidade LIQ (5 ng/mL), CQB (10 ng/mL), CQM (50 ng/mL) e CQA (75 ng/mL). A precisão intracorrída e intercorrída foi avaliada através do coeficiente de variação com base em todos os valores obtidos, o qual não apresentou valores superiores a 15%, incluindo o LIQ, para o qual é aceitável CV de até 20% (Tabela 2). A exatidão intraensaio e interensaio foi determinada através do erro padrão relativo (EPR) o qual apresentou valores inferiores a $\pm 15\%$ do valor nominal para todas as concentrações analisadas. Os resultados obtidos mostram que o método é preciso e exato.

A estabilidade foi demonstrada após ciclos de congelamento e descongelamento, estudo de curta duração e pós-processamento. Amostras dos controles de qualidade CQB (10 ng/mL) e CQA (75 ng/mL) foram preparadas e analisadas em triplicata e uma curva analítica recém preparada foi utilizada para determinar a concentração das amostras. A estabilidade foi demonstrada, pois a média das concentrações obtidas em relação ao valor nominal não apresentou desvio superior a 15% (Tabela 2).

Tabela 2 – Limites de confiança do método de análise de nifedipino em leite materno humano por LC-UV.

	Nifedipino
Linearidade (5 – 150 ng/mL)	0,001x-0,001
r^2	0,9938
Precisão Interensaios (CV%, n=15)	
LIQ (5 ng/mL)	10,9
CQB (10 ng/mL)	4,5
CQM (50 ng/mL)	4,3
CQA (75 ng/mL)	3,1
Precisão Intra-ensaio (CV%, n=5)	
LIQ (5 ng/mL)	11,1
CQB (10 ng/mL)	1,4
CQM (50 ng/mL)	4,4
CQA (75 ng/mL)	1,2
Exatidão Interensaios (EPR%, n=15)	
LIQ (5 ng/mL)	-4,7
CQB (10 ng/mL)	-2,7
CQM (50 ng/mL)	-1,4
CQA (75 ng/mL)	-2,2
Exatidão Intra-ensaio (EPR%, n=5)	
LIQ (5 ng/mL)	-2
CQB (10 ng/mL)	-0,2
CQM (50 ng/mL)	1,0
CQA (75 ng/mL)	2,6
Estabilidade (EPR%, n=3)	
<i>Curta Duração</i> (6h à 23°C)	
CQB (10 ng/mL)	-1,9
CQA (75 ng/mL)	-0,1
<i>Pós-processamento</i> (24h à 18°C)	
CQB (10 ng/mL)	-0,5
CQA (75ng/mL)	0,2
<i>Congelamento/descongelamento</i> (3 ciclos)	
CQB (10 ng/mL)	1,0
CQA (75 ng/mL)	0,3

CV = coeficiente de variação [(desvio padrão/média) × 100]; r = coeficiente de correlação linear, %
 Inexatidão = [(concentração obtida – concentração real)/concentração real] × 100; LIQ: limite de quantificação; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de média concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração;

4.3 Aplicação do método

O método validado foi aplicado à investigação da concentração plasmática e em leite materno de nifedipino em mulheres hipertensas lactantes em uso crônico do fármaco (comprimidos de liberação controlada, na dose de 20 mg a cada 12 horas) atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. A Tabela 3 mostra as concentrações plasmáticas e as concentrações em leite materno de nifedipino em cada paciente.

Tabela 3 – Concentração de nifedipino no plasma e leite maternos nas pacientes investigadas no estudo (n=15)

Pacientes	Concentração plasmática (ng/mL)	Concentração no leite materno (ng/mL)	Razão L/P
1	49,7	4,8	0,10
2	53,2	74,8	1,40
3	44,3	58,5	1,32
4	46,9	13,1	0,28
5	178,1	10,5	0,06
6	54,8	40,2	0,73
7	38,0	93,8	2,47
8	71,0	5,2	0,07
9	46,0	57,2	1,24
10	11,8	11,8	1,00
11	43,3	25,6	0,59
12	14,6	5,5	0,37
13	73,8	10,5	0,14
14	13,9	13,9	1,00
15	12,9	32,4	2,52
Média	50,1	30,5	0,9
Desvio padrão	40,6	28,3	0,8
Mediana	46,0	13,9	0,73
Percentil 25-75	26,3-54,0	10,5-48,7	0,21-1,28

5 CONCLUSÃO

Os métodos desenvolvidos e validados mostraram seletividade, precisão e exatidão, com um limite de quantificação de 10 ng/mL para o plasma e 5 ng/mL para o leite materno, podendo ser aplicados para a análise quantitativa de nifedipino nesses fluídos biológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-AUDA, H. S.; NAJJAR, T. A.; AL-KHAMIS, K. I.; AL-HADIYA, B. M.; GHILZAI, N. M.; AL-FAWZAN, N. F. Liquid Chromatographic Assay of Nifedipine in Human Plasma and its Application to Pharmacokinetic Studies. **J. Pharm. Biomedic. Anal.** v.22, n.2, p.241-249, 2000.

American Academy of Pediatrics Committee on Drugs. The transfer of drugs and other chemicals into human milk. **Pediatrics**, v. 108, p. 776-789, 2001.

AZEREDO, F. J. Papel da Glicoproteína-P na Farmacocinética e nas Interações Medicamentosas. **Rev Bras Farm**, v. 90, p. 321-329, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria da Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. **Amamentação e uso de medicamentos e outras substâncias**. 2. ed – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional De Vigilância Sanitária: Resolução RDC n° 27 de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Disponível em: www.anvisa.com.br.

BRIGGS, G. G.; FREEMAN, R. K.; YAFFE, S. J. **Drugs in pregnancy and lactation**. 6th ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2002.

BRUNTON, L. L.; GOODMAN & GILMAN: As bases farmacológicas da terapêutica. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CHAVES, R.G. Medicamentos e amamentação: atualização e revisão aplicadas à clínica materno-infantil. **Rev. Paul. Pediatr.**, v. 25, n. 3, p. 276-288, 2007.

COSTA, A.G.; DOMICIANO, M.F. Medicamentos e lactação: Uma revisão do tema. Monografia apresentada à Universidade Católica de Goiás (Para obtenção do título de Especialista em Farmácia Clínica) – Goiânia, 2008.

DANDENAU, R.D.; ZERENNER, E.H. **High Resol. Chromatogr.** Commun. v. 1, p. 351, 1979.

DEL CIAMPO, L. A.; FERRAZ, I. S.; DANELUZZI, J. C.; RICCO, R. G.; MARTINELLI JÚNIOR, C. E. Aleitamento Materno e o uso de medicamentos durante a lactação. **Rev. Paul. Pediatr.**, v. 25, n. 4, p. 355-7, 2007.

EDDABRA, L.; WENNWE, T.; EI BTAOURI, H.; BARANEK, T.; MADOULET C.; CORNILLET-LEFEBVRE,P.; MORJANI, H. Arginine 482 to Glycine Mutation in ABCG2/BCRP Increases Etoposide Transport And Resistance to The Drug in HEK-293 Cells. **Oncol. Rep.**, v. 27. n. 1, p. 232-7, 2012, doi: 10.3892/or.2011.1468.

EHRENKRANZ, R. A.; ACKERMAN, B. A.; HULSE, J. D. Nifedipine transfer into human milk. **J. Pediatr.**, v. 114, n. 3, p. 478-480, 1989.

EYAL, S.; KIM, J. D.; ANDERSON, G. D.; BUCHANAN, M. L.; BRATENG, D. A.; CARR, D.; WOODRUM, D. E.; EASTERLING, T. R.; HEBERT, M. F. Atenolol Pharmacokinetics and Excretion in Breast Milk During the First 6–8 Months Postpartum. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 50, n. 11, p. 1301–1309, 2011.

FILGUEIRA, G. C. O.; FILGUEIRA, O. A. S.; CARVALHO, D. M.; MARQUES, M. P.; MOISÉS, E. C. D.; DUARTE, G.; LANCHOTE, V. L.; CAVALLI, R. C. Analysis of Nifedipine in human plasma and amniotic fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to clinical pharmacokinetics in hypertensive pregnant women. **J. Chromatogr. B**, v. 993-994, p. 20-25, 2015.

FROMM, M. F.; KIM, R. B. Drug Transporters: Handbook of Experimental Pharmacology. **Springer**, v. 201, 2004.

GARBACZ, G.; GOLKE, B.; WEDEMEYER, R. S.; AXELL, M.; SÖDERLIND, E.; ABRAHAMSSON, B.; WEITSCHIES, W. Comparison of Dissolution Profiles Obtained From Nifedipine Extended Release Once a Day Products Using Different Dissolution Test Apparatuses. **J. Pharm. Scienc.**, v. 38, n. 2, p. 147-55, 2009.

GHANEM, F.; MOVAHED, A. Use of Antihypertensive Drugs During Pregnancy and Lactation. **Cardiovasc. Ther.**, v. 26, n. 1, p. 38-49, 2008.

GIANNUBILO, S. R.; BEZZECCHERI, V.; CECCHI, S.; LANDI, B.; BATTISTONI, G. I. VITALI, P.; CECCHI, L.; TRANQUILLI, A. L. Nifedipine versus labetalol in the treatment of hypertensive disorders of pregnancy. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 286, n. 3, p. 1-6, 2012.

GRUNDY, J. S., KHERANI, R., FOSTER, R. T. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for nifedipine in human plasma utilizing ultraviolet detection. **Journal of Chromatography.**, v. 654, p. 146-151, 1994.

GUO, Y.; DAI, J.; QIAN, G.; GUO, N.; ZHENG, M.; GUO, X. Determination of nifedipine in human plasma and its use in bioequivalence study. **Int. J. Pharmac.**, v. 341, n. 1-2, p. 91-96, 2007.

HALE, T. W. Medications and Mother's Milk. 13th edition. **Amarillo: Hale Publishing.**, v. 1172, 2008.

HAN, JI-YOUN.; LIM, H.; SHIN, E. S.; PARK, Y. H.; LEE, S. Y.; LEE, J.; LEE, D. H.; KIM, H. T.; LEE, J. S. Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 Polymorphisms With Irinotecan-Pharmacokinetics and Clinical Outcome in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. **Americ. Canc. Soc.**, v. 110, n. 1, p. 138-147, 2007.

HERCEGOVA, A., DÖMÖTÖROVÁ, M., MATISOVÁ, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of Chromatography.**, v. 1153, p. 54–73, 2007.

IMAI, Y.; ISHIKAWA, E.; ASADA, S.; SUGIMOTO, Y. Estrogen-Mediated Post Transcriptional Down-Regulation of Breast Cancer Resistance Protein/ABCG2. **Canc. Res.**, v. 65, n. 2, p. 596-604, 2005.

ISMAIL, O. H.; CATANI, M.; PASTI, L.; CAVAZZINI, A.; CIOGLI, A.; VILLANI, C.; KOTONI, D. GASPARRINI, F.; BELL, D. S. Experimental evidence of the kinetic performance achievable with columns packed with new 1.9 μm fully porous particles of narrow particle size distribution. **J. Chromatogr. A**, v. 1454, p. 86-92, 2016.

JAMES, P. R.; PIERCY, C. N. Management of hypertension before, during and after pregnancy. **J. Heart**, v.90, p.1499-1504, 2004. doi: 10.1136/hrt.2004.035444.

JANKOWSKI, A.; LAMPARCZYK, H. E. Evaluation of Chromatographic Methods for the Determination of Nifedipine in Human Serum. **J. Chromat. A**, v. 668, p. 469-473, 1994.

JONKER, J. W.; MERINO, G.; MUSTERS, S.; VAN HERWAARDEN, A. E.; BOLSCHER, E.; WAGENAAR, E.; MESMAN, E.; DALE, T. C.; SCHINKEL, A. H. The Breast Cancer Resistance Protein BCRP (ABCG2) Concentrates Drugs and Carcinogenic Xenotoxins Into Milk. **Nat. Med.**, v. 11, n. 2, p. 127-9, 2005.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Basic & Clinical Pharmacology**. 12 ed. New York: McGraw-Hill Medical. 1054 p., 2012.

LEANDRO, C.C.; HANCOCK, P.; FUSSELL, R.J.; KELLY, B.J. **J. Chromatogr.** v. 1103, p. 94, 2006.

LEHOTAY, S.J.; HASLOVA, J. TRAC-Trend. **Analytical Chemistry**. v. 21, p. 686, 2002.

LI, J.; CUSATIS, G.; BRAHMER, J.; SPARREBOOM, A.; ROBEY, R. W.; BATES, S. E.; HIDALDO, M.; BAKER, S. Association of Variant ABCG2 and the Pharmacokinetics of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Patients. **Canc. Biol. e Therap.**, v. 6, n. 3, p. 432-438, 2005.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Quim. Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MANNINEN, A. K.; JUHAKOSKI, A. Nifedipine concentrations in maternal and umbilical serum, amniotic fluid, breast milk and urine of mothers and offspring. **J. Clin. Pharmacol.** v. 11, n. 5, p. 231-6, 1991.

MARTENS, J.; BANDITT, P.; MEYER, F. P. Determination of Nifedipine in Human Serum by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Validation of the Method and its Use in Bioavailability Studies. **J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.**, v. 660, n. 2, p. 297-302, 1994.

METZGER, I.F. Farmacogenética: Princípios, Aplicações e Perspectivas. Simpósio Farmacogenética. Medicina, Ribeirão Preto. v. 39, p. 515-21, 2006.

MICHAEL, C. A. Use of Labetalol in the Treatment of Severe Hypertension During Pregnancy. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 8, Suppl. 2, p. 211s–215s., 1979.

MIND THE GRAPH. CREATE BEAUTIFUL LIFE SCIENCE INFOGRAPHICS. Acesso em <https://mindthegraph.com>, jan. 2017.

NIOPAS, I.; DAFTSIOS, A. C. Determination of Nifedipine in Human Plasma by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography: Validation and Application to Pharmacokinetic Studies. **J. Pharmaceutic. Biomedic. Anal.**, v. 32, p. 1213-1218, 2003.

OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Quim. Nova.** v. 31, No. 3, p. 637-644, 2008

PAPATSONIS, D. N.; LOK, C. A.; BOS, J. M.; GEIJIN, H. P.; DEKKER, G. A. Calcium channel blockers in the management of preterm labor and hypertension in pregnancy. **J. Obstetr. Gynecol. Reproductiv. Biol.**, v. 97, p. 122-140, 2001.

PATEL, D. P., SHARMA, P., SANYAL, M., SINGHAL, P., SHRIVASTAV, P. S. Highly sensitive and rapid ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of nifedipine in human plasma and its application to a bioequivalence study, 2012.

PENNY, W.J.; LEWIS, M.J. Nifedipine is excreted in human milk. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 36, n. 4, p. 427-428, 1989.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B., ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica.** v. 3, p. 51-64, 2011.

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

PREVOST, R. R.; AKL, S. A.; WHYBREW, W. D.; SIBAI, B. M. Oral Nifedipine Pharmacokinetics in Pregnancy-Induced Hypertension. **Pharmacotherapy**, v. 12, n. 3, p. 174-7, 1992.

REFARGEN – Rede Nacional de Farmacogenética. Disponível em: <http://www.refargen.org.br>. Acesso em: 12/12/2016.

ROWE, H.; BAKER, T.; HALE, T. W. Maternal Medication, Drug Use, and Breastfeeding. **Pediatr. Clin. N. Am.**, v. 60, p. 275-294, 2013.

SACHS, H.C. The Transfer of Drugs and Therapeutics Into Human Breast Milk: An Update On Selected Topics. **Pediatrics**, v. 132, n. 3, p. e796-e809, doi: 10.1542/peds.2013-1985, 2013.

SCHELLENS, J. H.; VAN HAELST, I. M.; HOUSTON, J. B.; BREIMER, D. D. Nonlinear First-Pass Metabolism of Nifedipine in Healthy Subjects. **Xenobiotic.**, v. 21, n. 4, p. 547-55, 1991.

SHUKLA, S.; ROBEY, R. W.; BATES, S. E.; AMBUDKAR, S. V. The calcium channel blockers, 1,4-dihydropyridines, are substrates of the multidrug resistance-linked ABC drug transporter, ABCG2. **Biol.**, v. 45, n. 29, p. 8940-51, 2006.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Introduction to modern liquid chromatography. 3rd ed. **New York: John Wiley & Sons, Inc.** 2010.

SOONS, P. A.; SCHOEMAKER, H. C.; COHEN, A. F.; BREIMER, D. D. Intraindividual Variability in Nifedipine Pharmacokinetics and Effects in Healthy Subjects. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 32, n. 4, p. 324-331, 1992.

SOUSA, S. R.; BRAGA, A. F. A.; POTÉRIO, G. M. B.; BRAGA, F. S. S.; LOYOLA, Y. C. S.; FERNANDES, S. C. A. Influência da Nifedipina no Bloqueio Neuromuscular Produzido pelo Atracúrio e Pelo Cisatracúrio. Estudo em Preparações Nervo Frênico-Diafragma de Rato. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 56, n. 2, 2006.

SPARREBOOM, A.; GELDERBLUM, H.; MARSH, S.; RANJEET, A.; OBACH, R.; PRINCIPE, P.; TWELVES, C.; JAAP, V.; McLEOD, H. Diflomotecan Pharmacokinetics in Relation to ABCG2 421C>A genotype. **Clin. Pharmacol. Therap.** v. 76, p. 38-44, 2004.

VAN HERWARDEEN, A. E. Multidrug Transporter ABCG2/Breast Cancer Resistance Protein Secretes Riboflavin (Vitamin B2) into milk. **Mol. Cel. Biol.**, v. 27, n. 4, p. 1247-1253, 2007.

VORE, M.; LEGGAS, M. Progesterone Acts Via Progesterone Receptors A and B to Regulate Breast Cancer Resistance Protein Expression. **Mol. Pharmacol.**, v. 73, n. 3, p. 613-5, 2008.

WHO "WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: www.who.int. Acesso em: jan.,2017.

YAMASAKI, Y.; IERI, I.; KUSUHARA, H.; SASAKI, T.; KIMURA, M.; TABUCHI, H.; ANDO, Y.; IRIE, S.; WARE, J.; NAKAI, Y.; HIGUCHI, S.; SUGIYAMA, Y. Pharmacogenetic Characterization of Sulfasalazine Disposition Based on NAT2 and ABCG2 (BCRP) Gene Polymorphisms in Humans. **Clin. Pharmacol. Therapeutics.**, v. 84, n. 1, 2008.

YRITIA, M., PARRA, P., IGLESIAS E., BARBANO, J. M. Quantitation of nifedipine in human plasma by on-line solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography.** v. 870, p. 115-119, 2000.

ZENDELOVSKA, D.; SIMESKA, S.; SIBINOVSKA, O.; KOSTOVA, E.; SEVSKA, K. M. JAKOVSKI, K.; JOVANOVSKA, E. KIKERKOV, I.; TROJA, J.; ZAFIROV, D. Development of an HPLC method for the determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 839, p. 85–88, 2006.

ZU SCHWABEDISSEN, H. M.; KROEMER, H. K. In vitro and in Vivo Evidence for the Importance of Breast Cancer Resistance Protein Transporters (BCRP/MXR/ABCP/ABCG2). **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 201, p. 325-71, 2011. doi:10.1007/978-3-642-14541-4_9.

De acordo,

Orientadora

Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes

CRF: 67349 / SP

Aluno

Bruno Borsari

R.A.: 131110501