

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

LÍVIA TONIELO PAVAN

Métodos bioanalíticos para o monitoramento de fármacos no sangue

Ribeirão Preto

2024

LÍVIA TONIELO PAVAN

**Métodos bioanalíticos para o monitoramento de fármacos no sangue**

**Versão original**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Orientador: Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal

Ribeirão Preto

2024

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.

Pavan, Livia Toniolo

Métodos bioanalíticos para o monitoramento de fármacos no sangue/ Livia Toniolo Pavan; orientador, Jonas Augusto Rizzato Paschoal. Ribeirão Preto: FCFRP, 2024.

67 páginas.

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

1- Sangue. 2- Bioanalítico. 3- LC-MS/MS.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: PAVAN, Lívia Tonielo

Título: Métodos bioanalíticos para o monitoramento de fármacos no sangue.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do grau de Farmacêutico Bioquímico.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Este trabalho foi apresentado e aprovado pela Comissão de Graduação (Coordenadora do Curso) de Farmácia em 22/11/2024.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Maria Alice e Marco, pelo apoio incondicional durante toda a minha jornada acadêmica e nesta nova fase da minha vida. Sem o seu apoio, não seria possível a realização deste trabalho. Agradeço especialmente à minha mãe por sempre me encorajar a ter força para finalizar quando eu mais precisei, e ao meu pai por me fazer acreditar e me inspirar sempre na sua determinação inabalável.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal, que mesmo com os empecilhos provocados pela distancia, sempre esteve ao meu lado me orientando da melhor forma possível, e por ter me acolhido no momento em que decidi que meu trabalho de conclusão de curso seria dentro da sua área de atuação. Um muito obrigada também aos amigos do laboratório, que sempre deram seu melhor quando eu precisei de ajuda, e especialmente à doutoranda Sarah Chagas, por auxiliar enormemente e com muita dedicação em todo o processo de correção deste trabalho.

Aos amigos queridos, agradeço pela companhia, compreensão, conforto e ensinamentos que sempre recebo... vocês são uma das minhas grandes fortalezas na vida, deixando o caminho mais belo e mais suave.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, por me ensinar as belezas da profissão farmacêutica e ter me dado alguns dos melhores anos de minha vida.

À Deus, agradeço pelo amor e por me ajudar a cumprir meus objetivos.

## RESUMO

PAVAN, L. T. **Métodos bioanalíticos para o monitoramento de fármacos no sangue**. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo).

O monitoramento de fármacos no sangue consiste no acompanhamento das concentrações de uma substância ativa na circulação sistêmica, seja de humanos ou animais. O sangue é a matriz responsável pelo transporte de todos os fármacos que são administrados no organismo, sendo importante não somente para a sua distribuição, mas também por influenciar ativamente no comportamento do fármaco dentro do corpo por meio da ação em parâmetros farmacocinéticos. Assim, a identificação e quantificação de analitos que sejam fármacos no sangue é de grande interesse de áreas como a farmacocinética, toxicocinética, estudos de bioequivalência e nas práticas clínicas de monitorização terapêutica, sendo essas determinações fundamentais para desfechos regulatórios de aprovação de diferentes categorias de medicamentos e acompanhamento clínico após lançamento de um medicamento no mercado. Para a obtenção das informações de exposição sistêmica do corpo a um fármaco seja possível, métodos bioanalíticos são necessários, e neste trabalho, é apresentada uma visão geral sobre eles, dando enfoque na metodologia mais versátil, sensível e seletiva utilizada na rotina de determinação de fármacos no sangue atualmente, a cromatografia líquida associada a espectrometria de massas sequencial (do inglês, LC-MS/MS), e seus desafios; assim como aspectos relacionados à validação dos métodos bioanalíticos.

Palavras-chave: Sangue. Bioanalítico. LC-MS/MS.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Como o sangue participa da ação dos medicamentos.....	13
<b>Figura 2</b> - Componentes do sangue.....	18
<b>Figura 3</b> - Sistema de Ionização por Eletrospray.....	24
<b>Figura 4</b> - Etapas do procedimento bioanalítico.....	27

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>EMPREGO DO SANGUE COMO AMOSTRA</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Importância no sangue na ação dos medicamentos</b> .....	<b>11</b>
<b>3.2</b>	<b>Aplicações do monitoramento de fármacos no sangue</b> .....	<b>14</b>
<b>3.3</b>	<b>Estrutura do sangue</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4</b>	<b>Desafios do emprego do sangue como amostra para a bioanálise</b> .....	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>ETAPAS DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS CROMATOGRÁFICOS</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Preparo de amostra</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2</b>	<b>Separação e detecção</b> .....	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Outras técnicas de separação, identificação e quantificação</b> .....	<b>43</b>
<b>4.4</b>	<b>Desafios de bioanálise de diferentes fármacos</b> .....	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>VALIDAÇÃO ANALÍTICA</b> .....	<b>48</b>
<b>5.1</b>	<b>Tipos de validação analítica</b> .....	<b>48</b>
<b>5.2</b>	<b>Parâmetros empregados para a validação</b> .....	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>IMPORTÂNCIA DA QUÍMICA ANALÍTICA NA FORMAÇÃO DO PROFISSIONAL FARMACÊUTICO</b> .....	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O monitoramento de fármacos no sangue diz respeito ao processo de acompanhamento das concentrações de uma molécula ativa na circulação sistêmica de um indivíduo. Nas etapas pré-clínica e clínica de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos, o monitoramento de moléculas com potencial farmacológico e terapêutico é amplamente aplicado em estudos farmacocinéticos e toxicocinéticos. Bick e colaboradores, por exemplo, ressaltam a importância da realização de mais estudos farmacocinéticos para aumento do conhecimento do perfil farmacocinético no soro de inúmeros medicamentos contraceptivos hormonais, baseados em um composto progestênico e um estrogênico, visto que as moléculas progestogênicas estão relacionadas a efeitos cardiovasculares, cânceres no sistema reprodutor e susceptibilidade a doenças infecciosas (BICK et al., 2021).

Os estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência são outro tipo de situação onde podemos vislumbrar esse tipo de atividade como essencial para o lançamento de genéricos e similares no mercado, que normalmente apresentam melhor custo-benefício e são comparáveis aos produtos de referência em termos de atividade terapêutica. Os estudos de bioequivalência garantem a comparabilidade da área sob a curva de concentração de plasmáticas de um medicamento de referência e um potencial genérico e similar, sendo um requisito regulatório para a legitimar o uso desses medicamentos. Vale destacar que embora haja equivalência em termos de concentração de fármaco biodisponível, a bioequivalência não garante atividade terapêutica idêntica, apenas comparável a ponto de garantir um *status* de equivalência (CHOW, 2014; HASAN et al., 2021).

Além disso, na prática clínica, encontramos a monitorização terapêutica como o campo que se serve ativamente do monitoramento para ajustar doses de medicamentos a fim de atender necessidades individuais dos pacientes, com o objetivo de aumentar os resultados positivos à medicação e reduzir efeitos tóxicos. Pai Mangalore e colaboradores mostram como a monitorização terapêutica de antibióticos beta-lactâmicos deveria ser uma prioridade, pois são muito frequentemente prescritos em casos de sepse, sendo esse tipo de acompanhamento crucial para pacientes criticamente doentes, cujas alterações em volume de distribuição, devido a hipovolemia, hipotensão, situações de hipoalbuminemia, necessidade de suporte renal, terapias de substituição renal, entre outros, geram

alterações na concentração plasmática desses fármacos que podem levar a casos de toxicidade ou concentrações abaixo do limite inferior recomendado para que haja atividade terapêutica (PAI MANGALORE et al., 2023).

Assim, em suma, percebe-se que a determinação da concentração de fármacos no sangue é uma realidade presente em todo o ciclo de vida dos medicamentos. Isto é, desde o pré-registro (em outras palavras, do conjunto de ações que devem ser tomadas para possibilitar o registro) de medicamentos novos ou inovadores (1) e genéricos ou similares (2) e após o lançamento dos medicamentos no mercado (pós-registro).

Para estes primeiros (1), há a determinação quantitativa no sangue para a descoberta do seu perfil farmacocinético e toxicocinético de moléculas que estejam em estágio de “fármaco em potencial” (*New Chemical Entity* ou *New Drug Applicant*<sup>1</sup>), sendo possivelmente os futuros insumos farmacêuticos ativos (IFAs) de medicamento novos (definidos pela Anvisa como aqueles que contém uma nova molécula e observem as disposições da Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996); ou moléculas de futuros medicamentos inovadores (definidos como aqueles que dispõem de nova monodroga, nova associação, nova forma farmacêutica ou nova via de administração) (BRASIL, 2022).

Já para os medicamentos genéricos e similares (2), como mencionado, os estudos de bioequivalência são essenciais para garantir que estes possam obter o registro nesta condição regulatória, sendo um requisito da fase de pré-registro.

E a monitorização terapêutica, por fim, é o grande ponto de demanda de quantificação de fármacos no sangue na fase pós-registro, pois é realizada com medicamentos que já foram lançados no mercado e estão sendo ativamente empregados na terapêutica.

Entretanto, o processo de obtenção dos dados de concentração de uma molécula ativa no sangue exige a construção de um método, dentro do qual são elencadas algumas partes importantes: preparo de amostra, separação, detecção e validação. Essa é a estrutura básica de um método bioanalítico, ou seja, um método

---

<sup>1</sup> Os termos *New Chemical Entity* ou *New Drug Applicant* são uma nomenclatura utilizada pelo FDA para descrever as moléculas que apresentam atividade biológica e características estruturais farmacológicas promissoras, sendo possíveis novos fármacos. A consolidação destas moléculas como fármacos vem dos resultados dos pré-clínicos e clínicos comprovando sua segurança e eficácia terapêutica.

analítico focado na identificação e quantificação de analitos em matrizes biológicas (BRASIL, 2012).

O sangue é a principal amostra escolhida para estes estudos pois o cerne deles é a obtenção de dados farmacocinéticos. Em outras palavras, embora cada um deles tenha objetivos levemente diferentes, sejam aplicados em momentos diferentes, e tenham distinção em termos de *design* e escolhas realizadas, todos têm como base para responder às perguntas a que se destinam a obtenção de parâmetros farmacocinéticos (como área sob a curva, tempo de meia vida,  $C_{máx}$ ,  $T_{máx}$ , *clearance* etc). Estes, por sua vez, podem ser calculados a partir da construção de curvas de concentração no sangue *versus* tempo uma vez que a concentração de um fármaco no plasma tem relação direta com a sua concentração no fluido extracelular que circunda as células dos tecidos, sendo o sangue portanto um retrato da exposição sistêmica do corpo àquele fármaco. Além disso, o sangue e seus derivados, como plasma ou soro, são os tipos de matriz biológica mais empregados para essas análises também por serem amostras de fácil obtenção (RANG, H.P. J.M. RITTER, R.J. FLOWER, 2016).

Logo, monitorar concentrações plasmáticas permite entender como varia a concentração de moléculas disponíveis no plasma para que estas cheguem aos receptores (alvos farmacológicos) nos tecidos. E é esse tipo de entendimento farmacocinético que auxilia a modular as doses de medicamentos a fim de obter melhores respostas terapêuticas.

Várias ferramentas analíticas podem ser utilizadas para a quantificação das concentrações de fármacos no sangue. Contudo, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e a cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC, do inglês *Ultra-high Performance Liquid Chromatography*) associadas a espectrometria de massas sequencial formam o que chamamos de LC-MS/MS, ou seja, cromatografia líquida associada à espectrometria de massas sequencial. Sendo esse atualmente o carro chefe das análises devido à sua enorme sensibilidade, seletividade, versatilidade e rapidez, podendo ser aplicada na determinação das concentrações dos mais diversos tipos de moléculas (TAKTODE et al., 2024).

Assim, a LC-MS/MS é um formato extremamente útil de método bioanalítico. Como geralmente não é possível utilizar uma amostra de sangue, plasma ou soro sem nenhum tipo de tratamento, muitas técnicas de preparo de amostras estão

disponíveis para ajudar a superar alguns desafios analíticos que as matrizes complexas oferecem. Esses desafios estão principalmente relacionados à redução de efeito de matriz e aumento da detectabilidade dos analitos que estão muitas vezes presentes no nível de traços em amostras repletas de moléculas com ampla diversidade estrutural e complexidade. Além disso, a remoção (clean-up) da maior parcela possível de componentes endógenos da amostra também ajuda a eliminar a atividade de degradação causada por enzimas, por exemplo, evitando o consumo do analito antes que ele possa ser analisado (GRECO et al., 2023).

Neste trabalho, apresentamos uma visão geral sobre as etapas de um método analítico envolvendo LC-MS/MS para a quantificação de fármacos no sangue, passando pelo preparo de amostras, separação, identificação, quantificação e validação analítica.

## **2 METODOLOGIA**

Este trabalho é uma monografia produzida no formato de revisão narrativa (ROTHER, 2007), baseando-se em artigos científicos e documentos oficiais de agências reguladoras nacionais e internacionais com o intuito de descrever uma visão geral das análises quantitativas de fármacos no sangue, com ênfase nos métodos bioanalíticos baseados em LC-MS/MS.

## **3 EMPREGO DO SANGUE COMO AMOSTRA**

### **3.1 Importância no sangue na ação dos medicamentos**

O sangue possui extrema importância na nutrição e sobrevivência do organismo, o que se deve principalmente à sua característica marcante de ser um *meio de transporte* para as mais diversas substâncias (JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J, 2008). Nele circula toda a água, sais, nutrientes, gases, glóbulos vermelhos, glóbulos brancos (leucócitos), plaquetas e mensageiros químicos que são entregues para os tecidos do corpo, conectando e permitindo a comunicação entre sistemas. E assim sendo, é por meio dele também que as moléculas de fármacos são transportadas.

Nesse sentido, sabe-se que quando um indivíduo consome um medicamento, a molécula do insumo farmacêutico ativo (IFA) é absorvida, ou seja, passa do sítio de administração para a corrente sanguínea, chegando à circulação sistêmica, a partir deste momento, o sangue *transporta* as moléculas do IFA até os tecidos, que

contém o sítio de ação farmacológica. Em termos farmacocinéticos, esse transporte desde a circulação sistêmica até os receptores dos tecidos é chamado de distribuição, sem o qual não existe a ação farmacológica. Posteriormente, o sangue também é responsável por transportar as moléculas do fármaco para os principais órgãos de metabolização e excreção (como fígado e rins), resultando em sua eliminação do corpo (CRAIG; STITZEL, 2004).

O sangue pode ainda afetar parâmetros farmacocinéticos diversos na medida em que uma fração do total de um dado fármaco pode se ligar a proteínas plasmáticas, como a albumina (proteína mais abundante do plasma) ou a alfa-1-glicoproteína ácida. Essas interações dependem da afinidade do fármaco pela proteína e ocorrem de formas não específicas (hidrofóbicas, eletrostáticas) ou mais específicas. O cerne da questão está no fato de que o fármaco ligado a proteínas não consegue atravessar as membranas plasmáticas das células, não estando portanto biodisponível para atuar farmacologicamente nos tecidos. Sendo assim, a ligação a constituintes do sangue é uma maneira não somente de reduzir a biodisponibilidade do fármaco e retardar sua ação, na medida em que causa um efeito “reservatório”, mas também reduz o volume de distribuição, pois estes fármacos ficam mais restritos aos compartimentos vasculares (GOLAN et al., 2014).

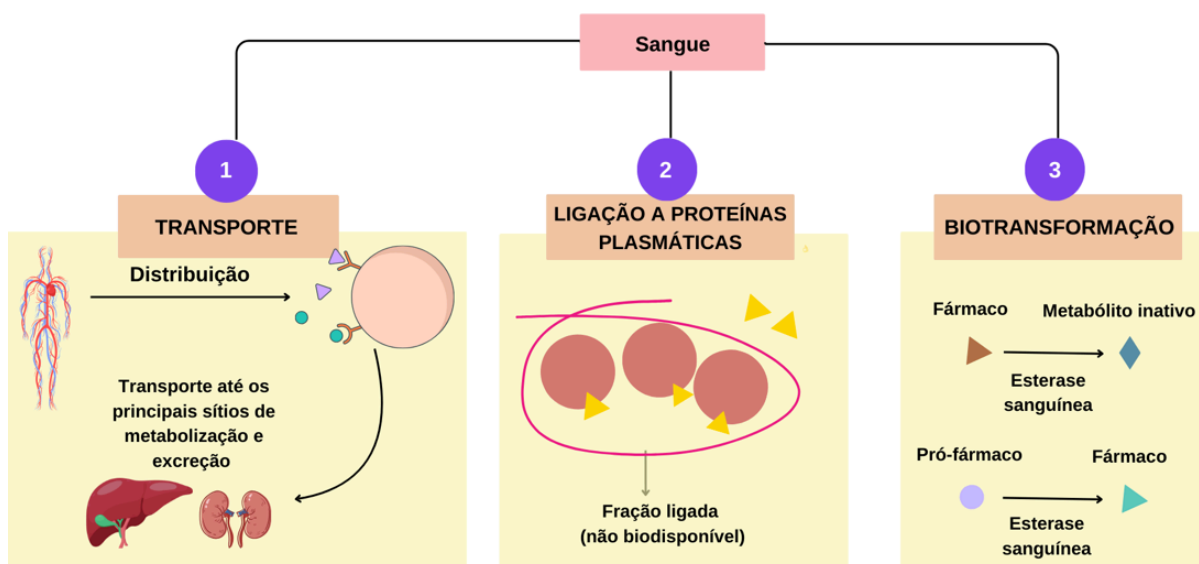
Outra situação em que elementos constituintes do sangue influenciam na farmacocinética (especialmente em termos de biodisponibilidade) de moléculas ativas é a biotransformação realizada por enzimas, como as esterases sanguíneas presentes nos eritrócitos. Um exemplo deste caso são as esterases que metabolizam o fármaco Esmolol (betabloqueador) muito rapidamente a partir da hidrólise de seus grupos ésteres, dando origem a um metabólito ácido muito menos ativo no antagonismo de receptores beta-adrenérgicos do que seu precursor, reduzindo a biodisponibilidade do IFA e a ação do medicamento (PEREIRA, 2007; FELDMAN, 2020).

Por outro lado, a biotransformação por enzimas circulantes no sangue pode, em contradição ao exemplo anterior, contribuir para os processos de conversão de pró-fármacos em fármacos, dando origem a metabólitos ativos. Neste caso, existe um aumento da biodisponibilidade sistêmica. O sucesso dos pró-fármacos está estampado na prática terapêutica, e uma das principais formas de utilizá-los é para mascarar certos grupos (que podem atrapalhar a permeabilidade do fármaco no trato gastrointestinal ou sofrer intenso metabolismo de primeira passagem) com

funções ésteres que podem ser posteriormente hidrolizadas por esterases sanguíneas, como é o caso do bambuterol e do enalapril (CHOUDHARY et al, 2020; MASSON; SHAIHUTDINOVA; LOCKRIDGE, 2023).

O esquema abaixo sintetiza e ilustra de forma figurativa essas situações:

**Figura 1: Como o sangue participa da ação dos medicamentos.**



**Fonte: Elaboração própria. As formas e cores empregadas na imagem não correspondem à realidade.**

Em (1) temos a representação do transporte do IFA (triângulos lilases e esferas verdes) até o sítio de ação farmacológica (os receptores na superfície da célula). Ou seja, durante a distribuição, o sangue opera como agente do encontro entre fármaco e receptor, a partir do qual pode existir a ação terapêutica. Logo abaixo, a indicação de que o sangue é o responsável por transportar o fármaco que eventualmente se desprende dos receptores (equilíbrio fármaco-receptor) até os principais sítios de metabolização e excreção (ex: fígado e rins), o que causará gradativa redução da biodisponibilidade do fármaco até a sua completa eliminação e fim da atividade terapêutica; (2) Ligação do fármaco (representado por pequenos triângulos amarelos) às proteínas plasmáticas do sangue (esferas vinho). Neste tipo de situação, o complexo fármaco-proteína plasmática (fração ligada) se torna uma espécie de reservatório. Essa situação é responsável por reduzir a biodisponibilidade do fármaco e retardar a sua entrada nos tecidos, tornando o tempo de ação do medicamento maior. Além disso, como o fármaco fica mais restrito ao compartimento vascular, seu volume de distribuição é menor; (c) Fármaco (triângulo marrom) é metabolizado por esterases sanguíneas presentes em

eritrócitos em metabólito inativo (losango azul). Outra situação é a metabolização de um pró-fármaco (esfera azul clara), por esterases sanguíneas, tornando-se fármaco (triângulo verde). No primeiro caso, existe redução da biodisponibilidade sistêmica, enquanto no segundo, há aumento.

### 3.2 Aplicações do monitoramento de fármacos no sangue

Na prática, a farmacocinética busca as concentrações plasmáticas dos ativos não somente pelo fato de o sangue distribuí-los, mas pelo fato de as concentrações de fármaco no plasma terem uma relação direta com a concentração de fármaco no líquido extracelular que circunda as células de todos os tecidos, que por sua vez, são onde estão os receptores ou alvos farmacológicos aonde os fármacos devem chegar. Além disso, a recorrência do uso dessas amostras é corroborado pelo fato de serem de fácil obtenção (por punção endovenosa) (ROSENBAUM, S., 2011; RANG, H.P. J.M. RITTER, R.J. FLOWER, 2016).

Os estudos farmacocinéticos são uma grande aplicação da determinação quantitativa de fármaco no sangue pois permitem caracterizar os parâmetros cinéticos (como biodisponibilidade,  $C_{máx}$ ,  $T_{máx}$ , área sob a curva, volume de distribuição, tempo de meia vida) que corroboram com o entendimento de como ocorre a evolução da exposição sistêmica do organismo a um determinado ativo. Embora a determinação de parâmetros farmacocinéticos possa ser feita por meio de abordagens *in silico* ou *in vitro* em estágios bastante prévios da pesquisa e desenvolvimento de medicamentos novos. Ruzycski e colaboradores, por exemplo, para uma avaliação prévia da performance farmacocinética do fármaco budesonida (forma farmacêutica de *pó seco* para aplicação por dispositivo de inalação), utilizaram dados de fluxo do pó provenientes de testes *in vitro* em um simulador da inalação para alimentar um modelo computacional da fisiologia do pulmão. Os resultados da disposição do fármaco sobre a superfície pulmão, por sua vez, alimentaram um sistema de modelagem farmacocinética para predição de parâmetros de exposição sistêmica *in vivo* do fármaco (RUZYCKI et al., 2020).

O uso do sangue como amostra para obtenção destes parâmetros costuma ocorrer posteriormente a esses estudos, fazendo-se o uso de *modelos pré-clínicos animais* com o objetivo de tentar reproduzir o comportamento do ativo no organismo humano de forma mais fidedigna ou “realista”. Isto é, em um modelo vivo contendo a condição a ser tratada, e do qual se espera que os resultados sejam parecidos com

os previstos até o momento e preditivos para os resultados clínicos (SCHRAG; REGAL, 2016; YADAV et al., 2021).

Durante as fases clínicas, a farmacocinética segue sendo explorada nos estudos de fases I, II, III e IV. Humeniuk e colaboradores realizaram dois estudos de fase I com o fármaco Remdesivir (pró-droga antiviral inibidora de RNA polimerases virais) nas formas farmacêuticas solução ou pó líofilo para administração intravenosa a fim de avaliar seu perfil de segurança e farmacocinética. Os dados farmacocinéticos foram obtidos pela colheita de sangue e urina de indivíduos saudáveis que receberam as formulações de Remdesivir nos regimes de dose única ascendente e múltiplas doses ascendentes. As amostras coletadas em horários e dias especificados ao longo de cada estudo foram submetidas à análise por LC-MS/MS. As concentrações plasmáticas do Remdesivir e seus metabólitos intermediário e ativo (GS-704277 e GS-441524) foram determinadas com base em um método que ofereceu curvas de calibração com faixas lineares de 4 ng/mL–4000 ng/mL para o Remdesivir e 2 ng/mL–2000 ng/mL para GS-704277 e GS-441524. E com esse atributos, o método permitiu a determinação de uma série de parâmetros cinéticos, como área sob a curva do tempo zero até a última concentração quantificável, área sob a curva do tempo zero até infinito, área sob a curva no estado estacionário,  $C_{máx}$ ,  $T_{máx}$ , meia-vida de eliminação, *clearance*, *clearance* renal e volume de distribuição (HUMENIUK et al., 2020).

Tendo em vista a demanda constante por métodos capazes de quantificação de fármacos das mais variadas classes, há muitos exemplos recentes de desenvolvimento de métodos empregando variadas instrumentações analíticas poderosas, baseando-se especialmente na cromatografia líquida associada a alguns tipos de detectores.

Meirinho e colaboradores relatam em seu trabalho um método baseado em HPLC-UV para estudo farmacocinético da Rufinamida, fármaco com ação antiepiléptica de amplo espectro. O método foi aplicado em diferentes amostras de tecido de camundongos, como cérebro, fígado, rins e plasma. Durante o estudo, um dos achados do grupo foi que o parâmetro tempo máximo ( $T_{máx}$ ) da Rufinamida no plasma dos animais foi similar ao encontrado em humanos. A faixa de linearidade das curvas de calibração construídas foi 0,1 µg/mL - 30 µg/mL, sendo o limite inferior de quantificação igual a 0,1 µg/mL (MEIRINHO et al., 2019).

Por outro lado, Martínez-Chávez e colaboradores criaram um método com HPLC-FL para detecção simultânea do Irinotecan (agente antineoplásico e pró-droga) e SN-38 (metabólito ativo) em homogenatos de tecidos e *plasma* de camundongos. As curvas de calibração cobriram a faixa linear de 7.5ng/mL –1500 ng/mL para o Irinotecan e 5 ng/mL – 1000 ng/mL para o SN-38 (MARTÍNEZ-CHÁVEZ et al., 2020).

Já Mangla e colaboradores quantificaram Tamoxifeno e Sulforafano (agentes antineoplásicos associados) no *plasma* de ratos em alta escala usando UPLC-MS/MS. As faixas lineares de detecção dos ativos fornecidas pelas curvas de calibração foram, respectivamente, 8 ng/mL – 500 ng/mL e 30 ng/mL - 2000 ng/mL (MANGLA et al., 2020).

E de forma parecida, Majhi e colaboradores determinaram simultaneamente a concentração de Dextrometorfano (antitussígeno) e seu metabólito ativo Dextrorfano também por análise empregando UPLC-MS/MS para amostras de baixo volume de *plasma* (30µL). A proposta de uso de menores volumes de plasma atende muitos tipos de modelos animais em que este volume é um limitante, além de tornar os estudos farmacocinéticos *in vivo* mais “*animal friendly*”. A linearidade do método proposto era de 0,196 ng/mL – 403,356 ng/mL para o fármaco Dextrometorfano e 0,102 ng/mL– 209,017 ng/mL para o metabólito Dextrorfano (MAJHI et al., 2023).

Dentro do contexto clínico, podemos destacar outros estudos clínicos, como o estudo de fase I feito por Bhadaliya e colaboradores, que quantificaram o alcalóide Sinoculina no plasma humano durante 10 dias com HPLC-MS. A Sinoculina ocorre em um produto fitoterápico constituído do extrato da espécie *Cocculus hirsutus*, podendo este ser empregado para tratamento de dengue. A faixa linear obtida no estudo para a quantificação da Sinoculina foi de 1,50 ng/mL –103,75 ng/mL (BHADALIYA et al., 2022).

Entretanto, além dos estudos farmacocinéticos, a toxicocinética também aplica a identificação e determinação das concentrações de fármacos *versus* tempo no sangue. Vale ressaltar que, em essência, um estudo toxicocinético também busca os parâmetros farmacocinéticos. A diferença que explica sua separação é que nos estudos toxicocinéticos são testadas doses de fármaco mais elevadas com o propósito de avaliar segurança perante exposição sistêmica à droga. Sendo assim, a toxicocinética nada mais é do que uma extensão da farmacocinética que ocorre

essencialmente de forma *não clínica* empregando diversos modelos animais a fim de determinar doses letais e limites de exposição (SCHRAG; REGAL, 2016).

Neste contexto, Swart e colaboradores determinaram as concentrações do ativo SUL-138 no sangue de ratos e mini porcos com HPLC-MS/MS em estudo de doses repetidas por 30 dias. Este ativo tem a propriedade de melhorar a função mitocondrial e está sendo estudado para aplicação em doenças crônicas (como diabetes e câncer). Os autores apresentaram os valores obtidos de NOAEL (dose onde não são observados efeitos adversos) com limites de detecção sendo de 0,456 ng/mL e 0,38 ng/mL para ratos e mini porcos, respectivamente (SWART et al, 2024).

Outro contexto em que o monitoramento de fármacos no sangue é aplicado é no estabelecimento de relações de bioequivalência, que pode ser entendida como a existência de biodisponibilidades estatisticamente equivalentes entre dois medicamentos equivalentes farmacêuticos administrados pela mesma via e avaliados sob mesmo desenho experimental. E é por meio dos estudos de bioequivalência que são comparados os parâmetros farmacocinéticos associados à biodisponibilidade entre um medicamento de referência e um medicamento genérico ou similar (BRASIL, 2002).

A exemplo desta situação, temos o estudo de bioequivalência entre formulações contendo o ativo Oxalato de Escitalopram, sendo elas Escitalopram 20mg Eurofarma® e Lexapro®. O estudo comparou a área sob a curva ( $ASC_{0-t}$  e  $ASC_{0-\infty}$ ) e concentração máxima ( $C_{máx}$ ) da molécula de Escitalopram no plasma dos participantes para as duas formulações. A construção das curvas de concentração *versus* tempo foi possível a partir do emprego de LC-MS/MS e a faixa linear para a quantificação do ativo entre 0,400 ng/mL e 40,000 ng/mL (SVERDLOFF et al., 2023).

Não menos importante, temos ainda a monitorização terapêutica, que é uma intervenção clínica realizada quando um medicamento já está no mercado (durante o pós-registro de uma droga), sendo necessário medir as concentrações de fármacos em fluidos biológicos de um paciente, a fim de individualizar o regime de dose. Com isso, é possível evitar a sobre-exposição sistêmica mantendo a atividade terapêutica de forma específica para cada paciente (VAN NULAND et al., 2020).

Segundo Fang e colaboradores, os métodos mais confiáveis, sensíveis e de alta qualidade para a realização de monitorização terapêutica (quase sempre utilizando amostras de sangue, plasma ou soro dos pacientes) são os que envolvem

cromatografia líquida acoplada a detectores UV-Vis, fluorescência ou espectrometria de massas (FANG et al., 2024).

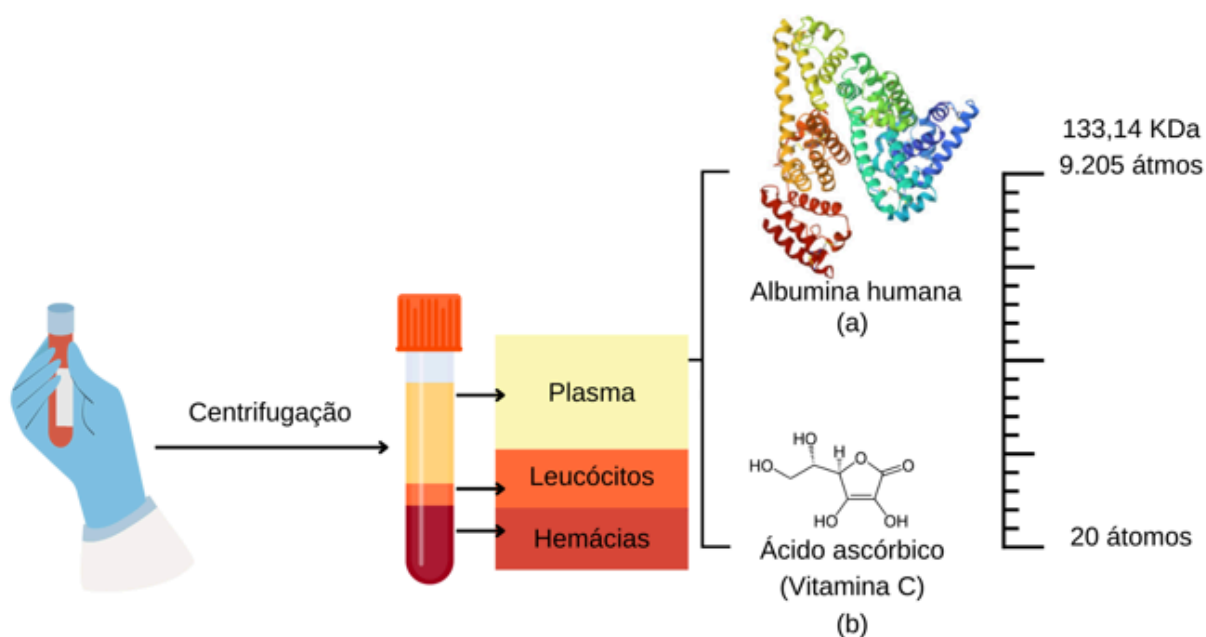
Barco e colaboradores, por exemplo, desenharam um método baseado em LC-MS/MS para a identificação e quantificação de 14 antibióticos (amikacina, amoxicilina, ceftazidima, ciprofloxacino, colistina, daptomicina, gentamicina, linezolida, meropenem, piperacilina, teicoplanina, tigeciclina, tobramicina e vancomicina) e um inibidor de beta-lactamase (tazobactam) partindo de amostras de somente 50  $\mu$ L de plasma humano. O objetivo do estudo foi desenvolver um método capaz de quantificar estes antibióticos, muito frequentemente administrados nas unidades de terapia intensiva, para assistir pacientes em estado crítico por meio da monitorização terapêutica, auxiliando assim a aumentar os resultados positivos da antibioticoterapia e reduzir a toxicidade provocada por estes fármacos. As amostras de plasma empregadas foram provenientes de pacientes pediátricos criticamente enfermos internados. Os limites inferiores de quantificação ficaram entre 0,3 ng/mL e 6 ng/mL (BARCO et al., 2020)

### **3.3 Estrutura do sangue**

O sangue é composto por uma parte líquida, o plasma, onde circulam água, gases, nutrientes na forma de sais, açúcares, proteínas, lipídeos, lipoproteínas (formando um conjunto que corresponde a cerca de 55% do sangue), plaquetas, glóbulos vermelhos (hemácias, cerca de 43% do sangue) e brancos (os leucócitos, cerca de 1-2% do sangue). Quando centrifugado, o sangue é separado em cerca de 3 fases visíveis a olho nu diferentes contendo estes grupos de componentes (JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO, J., 2008).

Abaixo, uma representação do sangue antes e depois de passar por processo de centrifugação:

**Figura 2: Componentes do sangue.**



Fonte: elaboração própria.

Após a centrifugação, forma-se uma fase mais densa constituída pelas hemácias, ocupando um volume de aproximadamente 43%. Entre a camada mais densa de hemácias sedimentadas e o plasma existe uma fina camada de leucócitos (junto dos quais fica a fina camada de plaquetas). E por fim, o plasma transparente, camada menos densa e que ocupa o maior volume da coluna. Em (a) temos uma representação da estrutura obtida por cristalografia de raio X da proteína humana Albumina (proveniente do banco de dados Protein Data Bank), uma das mais abundantes proteínas plasmáticas do organismo; e em (b), a representação da molécula de ácido ascórbico (vitamina C). Observa-se a diferença de tamanho e complexidade entre estas duas moléculas, estimada na ordem de milhares de átomos. Essa é uma realidade presente no plasma sanguíneo, que possui desde moléculas com grande peso molecular e enorme complexidade até moléculas orgânicas e inorgânicas simples.

Quando falamos na composição do plasma em si, temos que aproximadamente 7% de sua composição (em volume) é relativa às proteínas plasmáticas - como as *albuminas*, *alfa*, *beta* e *gamaglobulinas/imunoglobulinas/anticorpos*, *lipoproteínas* e as proteínas que participam dos processos de *coagulação* sanguínea, dentro dos quais estão incluídas várias *enzimas* e *fatores enzimáticos*. Os sais inorgânicos correspondem a 0,9% da composição do plasma; sendo todo o restante correspondente aos sais

orgânicos (2,1%), como as vitaminas, hormônios, glicose e aminoácidos e a água (cerca de 90%) (JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO, J., 2008).

O sangue pode ser o ponto de partida para um método bioanalítico estando em três formatos diferentes: sangue total, plasma e soro.

Assim, quando a amostra empregada pelo método é o sangue total, estamos falando de uma amostra de sangue venoso, capilar ou arterial, uma suspensão composta pelos glóbulos vermelhos, leucócitos e a parte líquida, que é o plasma, de forma relativamente inalterada em relação ao seu estado *in vivo* (WHO, 2002).

O plasma, por sua vez, é a fração sobrenadante obtida após centrifugação do sangue coletado em tubos contendo um sistema anticoagulante. E o soro, a fração extracelular obtida após centrifugação do sangue induzido ao processo de coagulação (WHO, 2002).

A Organização Mundial da Saúde (do inglês WHO, *World Health Organisation*) considera que as amostras de plasma refletem melhor a condição fisiopatológica dos indivíduos, isso porque o processo de coagulação induzido para a obtenção de soro consome várias substâncias componentes do sangue, como glucose, proteínas totais e plaquetas, além de fazer com que o soro tenha um aumento da concentração de NH<sub>3</sub>-amida do fibrinogênio (processo estimulado pelo fator de coagulação VIII). Logo, o soro tem alterações nas concentrações de certas substâncias fora de suas faixas permitidas no fluido extracelular (WHO, 2002).

Contudo, a grande maioria dos ativos pode ser analisada sem diferenças significativas em amostras de plasma ou soro. Amostras de plasma para monitorização terapêutica normalmente vem de tubos contendo o anticoagulante EDTA sódico, mas tubos sem sistema anticoagulante ou contendo ativador de coágulo para amostras de soro também são aceitos (PECK PALMER; DASGUPTA, 2021).

Uma exceção emblemática em que o sangue total é preferido em relação ao uso de amostras de plasma ou soro é o dos fármacos imunossupressores. Zheng e colaboradores, por exemplo, desenvolveram um método para quantificação de 6 imunossupressores diferentes a partir de amostras de *sangue total* coletadas em tubos contendo sistema anticoagulante. Essas amostras foram diretamente submetidas ao preparo por QuEChERS modificado, o sobrenadante foi seco por nitrogenação e ressuspendido em metanol. O sistema de separação e detecção empregado foi HPLC-MS/MS, sendo apropriado para o monitoramento das

concentrações de imunossupressores em pacientes com doenças autoimunes, hipersensibilidades ou passando por transplantes (ZHENG et al., 2022).

É sabido que agentes imunossupressores como Ciclosporina, Tacrolimus, Sirolimus e Everolimus classicamente necessitam de monitorização terapêutica devido à sua janela terapêutica estreita. E para tal, a amostra de escolha é o sangue total, já que esses fármacos se distribuem de forma desigual entre plasma, eritrócitos e outros elementos do sangue (WADHAWAN; GUPTA, 2023).

Assim, o sangue total é preferido em casos em que seja necessário fazer a identificação e quantificação de fármacos que possuem afinidade pelas células sanguíneas (AGILENT, s.d.).

A Digoxina é um fármaco da classe dos glicosídeos cardiotônicos usado na terapêutica de arritmias cardíacas. Seu caso se destaca, por sua vez, pelo fato de que apesar de existirem estudos que realizaram a determinação da Digoxina no plasma empregando metodologias LC-MS/MS (BALLOTARI et al., 2022; XING et al., 2020; YANG et al., 2023). Dukic e colaboradores defendem a intercambialidade do uso de amostras de plasma ou soro para a quantificação de Digoxina com base resultados provenientes de método de imunoensaio (DUKIĆ; ŠIMUNDIĆ; MALOGORSKI, 2014).

Entretanto, alguns materiais sugerem o uso de amostras de soro, como por Rosenbaum e colaboradores, que afirmam que a medição da Digoxina no soro é preferível em relação à no plasma quando são utilizados anticoagulantes de Heparina, pois ela poderia interferir com a sua quantificação, mas não é dito em que tipo de método essa quantificação seria influenciada (ROSENBAUM, 2011).

Arslan e colaboradores compararam a estabilidade da Digoxina em diferentes tubos de coleta de sangue (tubos para soro contendo ativador de coágulo e gel de separação, tubos contendo anticoagulante lítio heparina sem gel de separação, tubos contendo anticoagulante lítio heparina com barreira de separação e tubos sem aditivos) e puderam concluir que a concentração de Digoxina permaneceu mais estável em uma das marcas de tubo para coleta de soro (contendo ativador de coágulo e gel de separação) do que nos outros, mas sem diferenças estatisticamente relevantes. Por outro lado, a concentração de Digoxina de tubo contendo lítio heparina sem gel de separação na marca teve redução significativa entre 0h e 48h, mas não foram exploradas as possíveis motivações dessa redução.

A quantificação dos testes foi realizada por meio de quimioluminescência (ARSLAN et al., 2020).

Os tubos contendo géis que facilitam a separação do plasma ou soro do restante da amostra podem também ser um fator a ser estudado durante a escolha do melhor tipo de amostra para a análise de um determinado fármaco no sangue. A presença desses géis poliméricos (acrílicos, silicone, poliéster) pode causar redução na concentração quantificada de fármaco, na medida em que uma parte do ativo pode ser absorvida de forma passiva pelo gel quando as amostras não são processadas e analisadas rapidamente. Apesar de a tecnologia dos géis ter sido melhorada para evitar essa absorção do analito, algumas espécies ainda são absorvidas pelos géis de tubos comercialmente disponíveis. De forma geral, os principais fatores envolvidos nesse tipo de fenômeno são a hidrofobicidade da molécula do ativo, já que os polímeros normalmente são hidrofóbicos, o tempo de contato entre o gel e os analitos na amostra, e a superfície de contato entre o gel e a amostra, que pode ser maior em tubos não enchidos com volume apropriado de sangue (PECK PALMER; DASGUPTA, 2021).

### **3.4 Desafios do emprego do sangue como amostra para a bioanálise**

O termo “bioanálise” diz respeito às análises feitas empregando métodos bioanalíticos, e os “método bioanalíticos” (mencionados anteriormente) são os métodos elaborados para detecção de analitos em matrizes de origem biológica.

Embora a diferenciação entre método analítico e bioanalítico seja expressa em termos terminológicos pelo acréscimo do prefixo *-bio*, podemos dizer que todo método bioanalítico é também um método analítico. No entanto, a recíproca não é verdadeira. Isso porque os métodos bioanalíticos são idealizados e construídos para amostras muito complexas, notavelmente, as amostras de origem biológica. Conforme descrito por Thakur e colaboradores, a bioanálise é um braço da química analítica destinado à quantificação de biomarcadores, entidades químicas, biológicas ou metabólitos em matrizes biológicas, como sangue, soro, urina, fluido cefalorraquidiano e tecidos (THAKUR et al., 2021).

Assim, o monitoramento de fármacos no sangue é uma forma de bioanálise e os métodos empregados para tal são métodos bioanalíticos. Um método bioanalítico compreende desde o preparo da amostra até as técnicas analíticas de separação e detecção.

O enriquecimento da amostra que será analisada ou, em outras palavras, a adição de concentração conhecida do analito, é uma etapa importante para aprimorar a detectabilidade do método, tornando mais fácil detectar o analito pelo sistema analítico, visto que muitas vezes os analitos estão presentes ao nível de traços nas amostras biológicas.

Enquanto que outros passos relacionados ao preparo de amostra, como extração e limpeza do extrato, estão relacionados ao isolamento do analito e eliminação da maior quantidade possível de moléculas endógenas capazes de atrapalhar o sinal analítico, afetando a reprodutibilidade e sensibilidade do método.

Este efeito danoso causado pela presença de um conjunto complexo de moléculas de diferentes classes e características é chamado de *efeito de matriz*. O efeito de matriz pode ser definido de forma prática como a diferença entre o sinal de um analito obtido dentro de uma matriz (com uma série complexa de componentes endógenos) e o obtido com o analito em uma solução padrão. E essa diferença pode ser na forma de supressão ou aumento de sinal (VAN EECKHAUT et al., 2009).

Como mencionado, as ações de extração (1), limpeza do extrato (2) e pré-concentração (3) do analito, cabem especialmente à etapa de preparo de amostra, responsável por disponibilizar uma subfração da amostra original enriquecida (mais concentrada) com o analito, o mais livre possível de interferentes para redução de efeito de matriz, com detecção adequada e tempo de análise razoável (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Dessa forma, se o preparo de amostra não é adequado, o resultado da bioanálise pode ser comprometido como um todo.

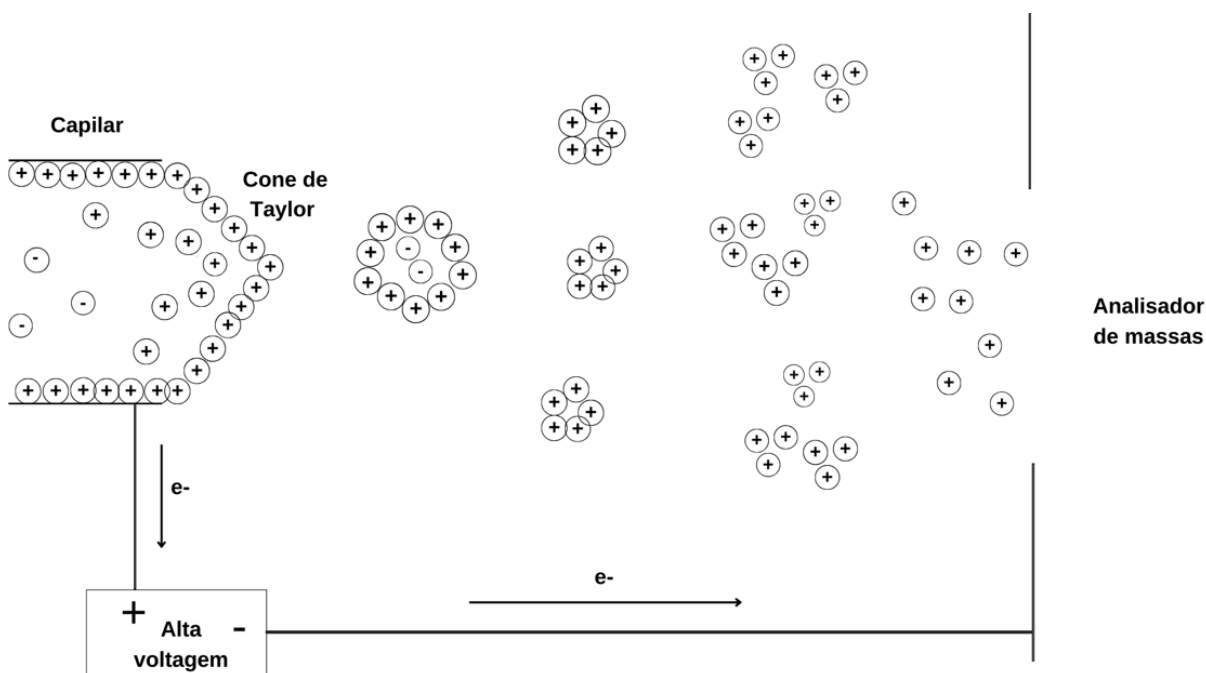
A enorme quantidade de proteínas do sangue é um dos primeiros desafios com que o analista deve lidar. Isso porque ele deve garantir que durante o desenvolvimento do método de preparo de amostra, a maior parcela possível dessas proteínas seja eliminada. A presença de proteínas e peptídeos na amostra pode facilitar a ligação do analito de forma não específica ou mais específica a essas substâncias, formando o que chamamos de adutos (produtos de reações de adição). Em análises realizadas por espectrometria de massas, os adutos podem gerar efeito de matriz na medida em que afetam a sensibilidade do método e sua reprodutibilidade. Nesse sentido, pode ocorrer uma diminuição da detecção do analito pelo detector, visto que a razão  $m/z$  do analito estará alterada (GOSETTI et al., 2010).

Outro prejuízo gerado pelo excesso de proteínas em amostras injetadas nas colunas cromatográficas é que elas podem acabar alterando aos poucos as propriedades do recheio da coluna cromatográfica, na medida em que essas moléculas podem interagir e se ligar na fase estacionária, entupindo-a (LIMA; CASSIANO; CASS, 2006).

Nos métodos envolvendo espectrometria de massas, além da possível formação de adutos com os analitos, destacam-se especialmente os efeitos de matriz que ocorrem na *fonte de ionização* nas fontes de ionização por eletrospray (do inglês ESI, *electrospray ionization*) ou ionização química à pressão atmosférica (do inglês APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*), que são dois tipos de fonte de íons consideradas “suaves” muito presentes nos espectrômetros de massas atualmente.

Abaixo, uma ilustração representando a fonte de ionização por ESI:

**Figura 3: Sistema de Ionização por Eletrospray.**



Fonte: Elaboração própria. Baseada em CROTTI; SERAGLIA; TRALDI, 2011.

Nas fontes de íons por ESI, a aquisição de carga ocorre no estado líquido. Para tal, o sistema funciona com base na aplicação de um potencial elétrico por meio de um eletrodo de alta voltagem que fica conectado ao capilar por onde passa a solução de analito (proveniente diretamente de uma coluna de cromatografia líquida em métodos de LC-ESI-MS ou LC-ESI-MS/MS). No modo de ionização

positiva, o objetivo é a geração de um excesso de íons positivos na solução ainda no capilar. Isso ocorre na medida em que, devido ao potencial do eletrodo, acontecem reações de oxidorredução na parede do capilar, dando origem a íons metálicos positivamente carregados ou retirando as cargas negativas dos íons negativos pré-existentes na solução. Os elétrons são direcionados para o eletrodo e formam uma corrente elétrica, fazendo com que a entrada do analisador de massas se torne o cátodo do sistema, enquanto o capilar é o ânodo. Embora os mecanismos de formação dos íons de analito ainda não sejam completamente conhecidos, observa-se que no modo positivo, devido ao excesso de cargas positivas, especialmente prótons, muitas espécies de analitos formam adutos com esses prótons.

A solução com excesso de cargas é então afunilada na ponta do capilar formando uma estrutura denominada cone de Taylor, do qual são ejetadas gotículas carregadas (devido à superação da tensão superficial e instabilidade provocada pelo aumento da densidade de cargas) que vão em direção ao cátodo (analisador de massas) e sofrem sucessivas fissões também devido à instabilidade de cargas e à evaporação do solvente (em função do calor e colisões com moléculas de um gás inerte aquecido bombeado no sistema). Assim, o analito, que adquiriu carga positiva durante o contato com as espécies positivas formadas na solução, é dessolvatado e volatilizado até estar em fase gasosa (ALLOCHIO FILHO et al., 2023).

Nesse tipo de sistema de aquisição de carga (onde ocorre a passagem do analito ionizado em solução para a fase gasosa à pressão atmosférica), quaisquer substâncias não voláteis integrantes da matriz podem reduzir a volatilidade das gotículas formadas após a passagem (da amostra separada no cromatógrafo) pela agulha injetora ou capilar da fonte de íons. Isso faz com que uma parte do analito fique retida nestas gotas. Em outras palavras, as gotas não passam de forma integral para o estado gasoso, retendo uma parte do analito no estado líquido. Outra hipótese é que os componentes não voláteis eventualmente precipitam à medida que o solvente evapora, carregando o analito junto consigo nesta parte precipitada (KING et al., 2000).

Além disso, supõe-se que os componentes não voláteis causam essa perda de volatilidade por aumentar a viscosidade e a tensão superficial das gotas.

A este fenômeno de redução do sinal de um analito por conta da menor quantidade de moléculas ionizadas que chegam ao detector é chamado de

*supressão iônica*. Ela por ser gerada também pela competição já na fase gasosa de substâncias interferentes muito básicas ou muito ácidas capazes de desprotonar ou protonar (no caso de uma fonte de íons operando no modo negativo) o analito carregado, neutralizando-o (ANTIGNAC et al., 2005).

Uma teoria muito ligada aos fosfolipídeos (constituintes das membranas celulares e presentes em grande concentração no plasma carregados por lipoproteínas) é a *supressão iônica* por conta de sua natureza surfactante (anfifílica). Assim, essas moléculas podem ter preferência pela interface *líquido carregada - ar* das gotículas durante o processo de ionização por ESI, competindo com o analito e impedindo seu acesso à carga (HALL et al, 2012).

Como mencionado, outra fonte de ionização bastante utilizada é a APCI. Ela é menos suscetível aos fenômenos de supressão iônica que acontecem na ESI, porque o analito primeiramente passa para a fase gasosa e depois adquire a carga. Entretanto, os efeitos de matriz de supressão iônica estão relacionadas à formação de precipitados devido à presença de compostos não voláteis que capturam os analitos carregados e os retiram da fase gasosa (KING et al., 2000), ou então pela competição do analito com compostos com maior afinidade de aquisição de carga (SANGSTER et al., 2004).

Em resumo, podemos dizer que, de forma geral, qualquer tipo de molécula dentro do *meio químico* (como sulfatos, fosfatos, lipídeos, peptídeos, proteínas etc) da amostra que atrapalhe/compita com o analito no processo de aquisição de carga ou que aumentem a sua intensidade de aquisição, gerando em vez de supressão, um aumento de ionização, correspondem a formas de efeito de matriz relacionadas à fonte de ionização (ICERI, 2011).

Outra questão importante a ser tratada com cuidado é a disponibilidade de alternativas de concentração/enriquecimento de um analito em uma amostra. Normalmente, as estratégias adotadas são a evaporação de solventes usados em processos de extração, como a extração líquido-líquido, seguido da ressuspensão em uma quantidade menor de solvente compatível com a fase móvel da coluna cromatográfica ou, no caso de sistemas de extração em fase sólida, a recuperação do analito por meio de sua dessorção da coluna com volume pequeno de solvente. Entretanto, a evaporação de um solvente é um processo que embora muito útil, apresenta o desafio de ser um passo adicional durante o preparo de amostra (exceto quando se trabalha com extração em fase sólida) envolvendo aquecimento para

garantir boas condições de detectabilidade. Assim, o maior desafio dessa estratégia é garantir a integridade do analito durante o processo, já que durante o aquecimento pode haver degradação de sua estrutura, ligação não específica às paredes do *vial* ou inabilidade do analito seco de ser solubilizado pelo solvente de reconstituição. Em sua revisão, Kumar e colaboradores elencam a evaporação do solvente de extratos como uma das causas de perdas de analitos por degradação em etapas pré-analíticas, recomendando que a caso a recuperação após evaporação e reconstituição < 85–90%, devem ser realizados ajustes na temperatura, tempo de secagem, usar *vials* tratados para evitar aderência do analito em suas paredes, mudar a composição do solvente de reconstituição, ou ainda considerar métodos de evaporação que não envolvam aquecimento, como por nitrogenação (KUMAR; GAUTAM; ALNOUTI, 2022). E vale ressaltar que embora esse não seja um desafio exclusivo do trabalho com amostras de sangue, ele certamente pode acontecer dependendo da escolha de preparo de amostra realizada e da concentração do fármaco naquela amostra.

O armazenamento é outro ponto a ser ressaltado quando se fala de amostras de sangue. Sabe-se que a estabilidade do analito nas amostras de sangue, plasma e soro deve ser avaliada durante o desenvolvimento do método ou durante o processo de validação. Além de requerer estudos de estabilidade de bancada (curta duração), de ciclos de congelamento e descongelamento, longa duração e de amostras processadas. Além da caracterização da estabilidade do analito para averiguação se o método é viável de ser realizado nessas condições, é exigido do laboratório que ele tenha a disponibilidade de equipamentos adequados para o armazenamento destas amostras. Moléculas pequenas, por exemplo, devem ser testadas quanto à sua estabilidade no sangue em temperaturas de -20°C para -70/-80°C, sendo necessário *freezers* que atinjam essa faixa de temperatura e um sistema de qualidade focado em garantir que esse intervalo seja respeitado (ICH, 2022).

#### **4 ETAPAS DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS CROMATOGRÁFICOS**

Um método bioanalítico vai do preparo de amostra até a análise instrumental do analito, o que pode ser sintetizado em 4 grandes etapas:

**Figura 4. Etapas do procedimento bioanalítico.**



Fonte: Elaboração própria.

O preparo de amostras é a primeira etapa de um método bioanalítico e deve contemplar o método no sentido de eliminar grande parte das espécies interferentes e proporcionar maior detectabilidade para o analito. Existem diversas estratégias aplicadas para preparo de amostra, cada uma contendo suas vantagens e limitações.

A separação costuma ser feita em colunas cromatográficas líquidas, gasosas ou eletroforéticas. Elas melhoram a performance do processo de identificação e quantificação na medida em que permitem que haja, idealmente, a separação de todos os tipos de moléculas presentes na amostra, de modo que cada fração de moléculas (dentre as quais está o analito) deve passar em tempos diferentes pelo detector.

Por fim, a detecção pode ser feita por detectores variados. Alguns dos exemplos mais comuns são por UV-Vis, Fluorescência, Refração, Eletroquímicos, Massas ou Ionização por chama (geralmente empregado para cromatografia gasosa). O detector é o instrumento que mede o sinal analítico e os dados coletados por ele são enviados para um sistema de aquisição de dados responsável por gerar um cromatograma.

A validação, por fim, é a última etapa, mas não menos importante. Na realidade, ela quem garante que o método pode ser utilizado com confiabilidade para o que se propõe.

#### 4.1 Preparo de amostra

O preparo de amostras é o primeiro componente de um método bioanalítico. Esta etapa consiste basicamente em *isolar/concentrar* ou *extrair/pré-concentrar* o analito, que está disperso em uma matriz complexa. Dizemos também que a partir do momento em que são realizadas as técnicas de tratamento de amostra, para que a molécula de interesse analítico seja extraída e concentrada em uma sub-fração da amostra original, temos como objetivo obter uma amostra mais “limpa” e livre de

interferentes, processo chamado de *clean-up* ou limpeza do extrato, que consiste na retirada da maior quantidade possível de componentes da matriz, aumentando a reprodutibilidade, sensibilidade e detectabilidade do método (FIGUEIREDO, E. C.; BORGES, K.B.; QUEIROZ, M.E.C, 2015).

Apesar do crescente interesse em moléculas biológicas (proteínas terapêuticas, especialmente anticorpos), as pequenas moléculas ainda constituem 90% das vendas globais da indústria farmacêutica, sendo seu “carro-chefe” (MAKURVET, 2021). Nesse contexto, a técnica analítica que tem ganhado há alguns anos enorme destaque para a bioanálise dessas pequenas moléculas de fármacos em amostras de sangue, plasma, ou soro é a cromatografia líquida associada a espectrometria de massas sequencial ou *tandem* (LC-MS/MS), tornando-se rotina em muitos laboratórios, sejam eles clínicos ou na pesquisa básica.

Isso pode ser percebido conforme mostrado na revisão realizada por Fang e colaboradores que toma como tema a monitorização terapêutica de drogas. Para praticamente todas as classes de drogas elencadas, a LC-MS/MS é uma opção viável dentro dos métodos cromatográficos disponíveis, notadamente permitindo monitorar grandes quantidades de moléculas simultaneamente, com alta seletividade, sensibilidade e rapidez (FANG et al., 2024).

Dessa forma, serão abordadas algumas das principais técnicas de preparo de amostra recorrentes nos métodos de LC-MS/MS para análise de matrizes biológicas.

A abordagem mais simples de tratamento de amostras que são matrizes complexas (como o sangue, plasma e soro) é a desproteínização. A precipitação de proteínas (PPT, *protein precipitation technique*) é uma técnica que tem como vantagens ser muito simples, rápida, e promover um massivo *clean-up* das proteínas da matriz biológica a ser analisada, melhorando a qualidade dos resultados.

A técnica pode ser feita pela adição de um solvente orgânico miscível em água, como a acetonitrila, metanol, isopropanol e acetona na quantidade de 2-5 volumes de amostra (CHANG et al., 2007), ou mesmo frações combinadas de diferentes solventes com modificações em suas quantidades e capazes de aumentar a quantidade ou chegar a praticamente 100% de proteínas precipitadas (LIU et al., 2007). Podem ser adicionados também sais, como o sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ) (JOSEFSSON; SABANOVIC, 2006) e sulfato de amônio ( $(NH_4)_2SO_4$ ) (GUPTA et al., 2017); ou ácidos fortes (ácido tricloroacético, ácido perclórico). Vale ressaltar que os

processos de PPT podem resultar na desnaturação das proteínas, isso porque a mistura normalmente é homogeneizada em vórtex para promover o contato entre solvente e as proteínas da amostra. Assim, o estresse mecânico da agitação ajuda não somente a liberar os analitos ligados às proteínas, mas também desnaturá-las. Ainda, os próprios solventes podem ser responsáveis pela desnaturação na medida em que reduzem sua hidratação na solução em que essas proteínas estão imersas e desestabilizam seus núcleos hidrofóbicos (FONSECA et al., 2006; DEVANSHU et al., 2010).

A mistura pode ser refrigerada para aumentar a eficiência de extração das proteínas da solução. Em seguida, é realizada uma etapa de filtração ou centrifugação a fim de que haja a separação entre o precipitado e o sobrenadante, que contém o analito (fármaco). Dependendo do tipo de solvente utilizado na precipitação, pode ser necessário diluí-lo em tampão aquoso ou evaporá-lo do sobrenadante para que ele não influencie na força da fase móvel, garantindo a compatibilidade da amostra que será injetada do sistema de cromatografia líquida com a fase móvel empregada (CHANG et al., 2007).

Entretanto, uma limitação da PPT é que ela não remove extensivamente outros interferentes (como fosfolípidos, ácidos graxos e lípidos) da matriz (CORTESE et al., 2020). Alguns solventes orgânicos podem fazê-lo, removendo uma parcela de fosfolípidos. Chambers e colaboradores, ao comparar o residual de fosfolípidos em amostras submetidas a PPT com acetonitrila e metanol, mostraram que o metanol gerou extratos contendo 40% a mais de fosfolípidos (CHAMBERS et al., 2007). Dessa forma, o solvente empregado pode ser otimizado para que haja uma remoção de maior quantidade de interferentes de outras classes além das proteínas.

Outra limitação é que, apesar de ser fácil e rápida, a PPT também não é muito seletiva, podendo causar co-precipitação do analito, especialmente dependendo do tipo de solvente utilizado. Souverain e colaboradores demonstraram recuperações bastante baixas dos analitos em amostras preparadas com ácido perclórico e ácido tricloroacético e supressão iônica impactante no sinal detectado por ESI-MS para os 3 tipos de PPT performados (acetonitrila, ácido perclórico e ácido tricloroacético) (SOVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004).

Outro método clássico no preparo de amostra é a extração líquido-líquido (do inglês LLE, *liquid-liquid extraction*). É uma técnica de preparo de amostra ainda

muito utilizada por ser simples em seu princípio, sendo capaz de gerar boas recuperações de analitos, especialmente os apolares. É feita a partir do uso de uma série de solventes orgânicos imiscíveis em água (como clorofórmio, éter, acetato de etila, metil tert-butil éter, n-butanol) sozinhos ou combinados (LI et al., 2021).

De forma geral, a LLE é capaz de extrair o analito e gerar extratos mais limpos de interferentes do que a PPT, possivelmente reduzindo significativamente o efeito de matriz durante a análise. Jemal e colaboradores destacam a existência de extrações muito limpas de fosfolipídeos, pois alguns tipos de solventes são capazes de extrair o analito, porém deixando grande parte dos fosfolipídeos presentes na amostra para trás, como é o caso do 1-clorobutano e do metil tert-butil éter (MTBE), bem como alguns tipos de misturas de solventes (JEMAL; OUYANG; XIA, 2010). Wang e colaboradores (2024) empregaram LLE com os solventes n-hexano e metil tert-butil éter (MTBE) para extração de vários tipos de hormônios esteróides de soro e tecido de câncer de mama humanos submetidos à análise por LC-MS/MS. A técnica foi a melhor opção encontrada para o *clean-up* dos extratos, gerando o menor número de interferentes (WANG et al., 2024).

Contudo, embora funcione relativamente bem para analitos apolares, que tendem a ter afinidade pelos solventes orgânicos imiscíveis em água, a recuperação de analitos mais polares oferece desafios maiores. Além disso, outra desvantagem da LLE é que para obter uma extração altamente eficiente, pode ser preciso realizar várias extrações consecutivas, o que significa a existência de procedimentos extensos e laboriosos, dependendo da habilidade e perícia do analista, aliados ao grande consumo de solventes orgânicos tóxicos para a saúde e meio ambiente (FARAJZADEH; NOURI; KHORRAM, 2014).

Uma estratégia adotada para melhorar a extração de analitos hidrofílicos é o uso de solventes orgânicos halogenados (como clorofórmio e diclorometano) em combinação com solventes miscíveis em água, como os álcoois (BYLDA et al., 2014). Ou lançar mão da extração líquido-líquido homogênea (do inglês HLLLE, *homogeneous liquid-liquid extraction*), que emprega diretamente solventes orgânicos miscíveis em água (como acetonitrila, metanol, etanol) na amostra. Neste último caso, a separação de fases se torna mais difícil, pelo fato de o solvente ter afinidade pelo meio da amostra (o sangue é majoritariamente aquoso). A adição de sal é uma alternativa mais conveniente e dá origem ao que chamamos de extração líquido-líquido assistida por sal (do inglês SALLE, *salt-assisted liquid liquid*

*extraction*), onde o sal ajuda a promover o efeito de *salting-out*, reduzindo a solubilidade do solvente no meio aquoso, facilitando a separação de fases e também ajudando na redução da polaridade do analito para que ele migre mais facilmente para o solvente de extração (HAMMAD et al., 2022).

É sempre importante estar também atento ao pH em que será realizada a separação de fases, a fim de tentar garantir que o analito esteja em sua forma não ionizada, desde que seja também estável nesta configuração, pois as separações são melhores performadas quando o analito está em seu formato não iônico (HAMMAD et al., 2022).

A extração em fase sólida (do inglês SPE, *solid phase extraction*) surge como uma alternativa à LLE. É uma técnica conhecida por sua capacidade de limpeza do extrato (*clean-up*) e que elimina vários pontos negativos da LLE, como o grande consumo de solventes orgânicos tóxicos, alto custo relacionado aos solventes de alta pureza empregados e apresenta menor tempo de processo, por mais que ainda envolve várias etapas. Além disso, a SPE é um procedimento passível de automatização, algo que não acontece com a LLE, o que já contribui para eliminação de erros de operação. Além disso, tem a vantagem de ser um método que envolve 3 procedimentos em um (extração, concentração e *clean-up*), podendo ser bastante otimizada quanto à sua seletividade de extração (gerando grande recuperação dos analitos) e possibilitando a pré-concentração junto com bons resultados de *clean-up*. (BADAWY et al., 2022).

Assim como na LLE, a SPE também se baseia no princípio de interação diferencial do analito entre duas fases, com a diferença de que nesta, a interação do analito ocorre entre a fase líquida da amostra e uma fase adsorvida (estacionária) em um suporte sólido. A configuração mais comum da SPE é quando a amostra é injetada no sistema, o analito é percolado e fica retido no material sorvente com alta seletividade, e depois de realizadas lavagens com água e solventes com baixa afinidade pelo analito para remover a maior parte dos componentes de matriz adsorvidos no material sorvente, o analito é eluído num processo chamado de dessorção pelo uso de pequena quantidade de solvente compatível com a fase móvel utilizada no método cromatográfico (BUSZEWSKI; SZULTKA, 2012).

Normalmente, o sistema de SPE é composto por um cartucho de propileno onde o material sorvente fica empacotado. Ele é imobilizado dentro do cartucho por dois filtros (um em cada extremidade) e antes da realização da corrida analítica, é

feita uma etapa de acondicionamento do sorvente para prepará-lo quimicamente para reagir com o analito no sentido de capturá-lo por meio da ativação de seus grupos funcionais. Algumas das fases estacionárias mais comuns são sílica, C<sub>18</sub> ou polímeros molecularmente impressos (JONES et al., 2022). Estes últimos são polímeros sintéticos *cross-linked* produzidos para ter alta afinidade por um analito ou por uma classe específica de moléculas com estruturas relacionadas (KHATIBI; HAMIDI; SIAHI-SHADBAD, 2021; WAN et al., 2021).

Zendelovska e colaboradores realizaram o preparo de amostra de plasma humano para a determinação de Diltiazem em HPLC usando LLE e SPE. Os dois métodos mostraram recuperações elevadas, com a extração por LLE empregando dietil éter alcançando recuperação entre 93,5 - 97,2% do analito e padrão interno; enquanto que o preparo com SPE apresentou recuperação entre 94,5% a 100,4% ao ser utilizado um tipo específico de material sorvente, um cartucho do tipo RP Select B. Já a extração feita com cartucho C<sub>18</sub> possibilitou uma faixa de recuperação de 73,3 a 80,4%, mostrando o quão importante é a seleção de um material adequado para compor a fase sólida estacionária do cartucho, pois ele influencia drasticamente na eficiência de recuperação do analito (ZENDELOVSKA; STAFILOV; STEFOVA, 2003).

Gupta e colaboradores mostraram que a reprodutibilidade e recuperação foram melhores com LLE empregando o solvente MTBE sob condições ácidas (0,5% de ácido fórmico) do que com SPE ou PPT com a finalidade de quantificar o fármaco antiviral DRV em plasma humano seguido de separação, identificação e quantificação em UPLC-MS (GUPTA et al., 2011).

Podemos perceber a partir da literatura que, embora a SPE pareça um método preferível por eliminar várias desvantagens da LLE e por vezes considerado mais seletivo (AGILENT, s.d.), não necessariamente ela sempre será a alternativa que melhor atende ao que o método bioanalítico precisa. Ou seja, todas as técnicas possuem vantagens e desvantagens e não existe uma resposta clara sobre qual é melhor usar. Cada uma delas pode ser otimizada, e dentro das suas limitações, oferecer resultados que podem ser considerados satisfatórios ou não dentro do contexto da análise que está sendo realizada. Muito do desempenho dos métodos está relacionado intimamente com a composição complexa diversa das amostras de sangue total, plasma e soro e com as características físico-químicas do analito, fazendo com que pequenas mudanças nessas variáveis possam levar a diferentes

escolhas de técnica de preparo de amostra que proporciona melhor seletividade, recuperação do analito, *clean-up* e concentração.

Saindo um pouco do espectro das técnicas de preparo de amostra mais tradicionais, atualmente destaca-se uma grande tendência frente às técnicas de preparo de amostra, que é a miniaturização. Ou seja, através do emprego dos princípios da química verde, utilizando menor quantidade de solventes e gerando menos resíduos, de forma a contribuir com a preservação do meio ambiente (AGRAWAL et al., 2021).

A DLLME, ou microextração líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction*), pode ser entendida como uma espécie de formato miniaturizado da técnica LLE. A DLLME faz uso essencialmente de 3 elementos: solvente extrator, solvente dispersor e amostra. Uma mistura dos solventes extratores e dispersores é preparada e injetada na amostra, de modo que o solvente extrator, sendo imiscível no meio aquoso da amostra, ficará disperso. Enquanto isso, o solvente dispersor deve ser miscível tanto no solvente extrator quanto na amostra, ajudando a dispersar o solvente orgânico imiscível e protegendo o analito de ser adsorvido nas paredes do recipiente onde a extração é performada. O analito migra então para as gotículas do solvente extrator dispersas na amostra (de acordo com seu equilíbrio de partição), e pelo fato de a superfície de contato entre as fases imiscíveis ser muito alta (muito superior à observada na LLE), a extração acaba sendo *bastante rápida*, ou *tempo independente*. Depois disso, é realizada a etapa de centrifugação, por meio da qual as gotas dispersas do solvente extrator são sedimentadas, formando uma fase que pode ser recolhida e separada em outro recipiente (REZAEI et al., 2006; MARTINS et al., 2012).

A DLLME é naturalmente capaz de oferecer *altas eficiências de extração* e *fator de enriquecimento* (concentração do analito) com grande *rapidez*, sendo uma operação simples, de baixo custo e ambientalmente amigável (OJEDA; ROJAS, 2011). Em seu formato mais tradicional, a DLLME emprega um solvente orgânico como extrator e um solvente orgânico de maior polaridade (miscível também em fase aquosa) como solvente dispersor. A centrifugação é uma forma de quebrar a emulsão criada assim que a mistura de solventes é aplicada na amostra e agitada. A agitação para a formação de emulsão pode ser feita manualmente ou com auxílio de equipamentos (ultrassons, vórtex e outros homogeneizadores). E comumente, são utilizados solventes extratores com densidade maior do que a da água. Entretanto, a

modificação das características originais da DLLME trouxe avanços no sentido de possibilitar extrações empregando solventes com densidades menores, como o 1-undecanol, em substituição aos solventes halogenados e clorofórmio de alta densidade, ou a realização de vários ciclos de extração por meio da “ressuspensão” da dispersão diversas vezes dentro de uma seringa, processo conhecido como *air-assisted DLLME*, ou também extrações baseadas em líquidos iônicos e solventes eutéticos (eliminado a necessidade de solvente dispersor). A otimização da DLLME pode ser feita com o controle de parâmetros como temperatura, pH e também o tipo e volume dos solventes utilizados (TAY; SEE, 2023).

A SPME (microextração em fase sólida) é também outra técnica miniaturizada relevante dentro do contexto analítico, permitindo extrair compostos orgânicos de amostras líquidas, sólidas e gasosas. Ela se configura como uma extração em fase sólida, com a diferença de que em vez de um cartucho ao qual está adsorvida a fase estacionária, faz-se uso de um capilar (fibra) cuja superfície interna está revestida por uma fase estacionária polimérica, entre outras classes de solventes, como materiais baseados em carbono, líquidos iônicos e materiais organo metálicos. Outra vantagem é que, seguindo a premissa das técnicas miniaturizadas, exige pouca quantidade de amostra e pequena quantidade de solvente de lavagem e para dessorção do analito da fibra (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990; DUGHERI et al., 2022).

Além de ser rápida e de baixo custo, ela é facilmente automatizável (podendo ser incrementada de forma *on-line*) e pode ser usada para performar *in situ*. Vale ressaltar, entretanto, que se trata de uma técnica muito bem aplicada *on-line* junto à cromatografia gasosa (GC), e que embora isso também seja feito para a cromatografia líquida (LC), normalmente prefere-se realizar o passo da dessorção do analito da fibra empregada na SPME de modo *off-line*. Essa diferença acontece porque no contexto da GC, a dessorção do analito da fase estacionária pode ser feita de forma térmica usando os mesmos passos do processo de injeção da amostra no cromatógrafo. Já a dessorção do analito da fibra antes da entrada da amostra na coluna de LC exige um fluxo de solvente mais lento e com menor pressão, e por isso não pode ser acoplada diretamente na coluna cromatográfica (ZAMBONIN; ARESTA, 2021).

O método QuEChERS, cujo nome é na verdade um acrônimo para as qualidades (Rápido - *Quick*, Fácil - *Easy*, Barato - *Cheap*, Efetivo - *Effective*, Robusto - *Rugged* e Seguro - *Safe*) destacadas pelos seus autores, Anastassiades e

colaboradores, foi originalmente desenvolvido com o intuito de tratar amostras de alimentos para determinação multirresíduo de pesticidas com diferentes características químicas (ANASTASSIADES et al., 2003; SANTANA-MAYOR et al., 2019). Atualmente, ele é empregado para além da determinação de pesticidas em alimentos, sendo muito difundido para análises de amostras ambientais (solos, sedimentos, água), no campo farmacêutico em diversos fluidos biológicos e também para análises de resíduos de medicamentos e seus metabólitos em alimentos de origem animal (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015; PRATIWI et al., 2023).

O surgimento do método QuEChERS foi tido como tão “inovador” e importante pelo fato de que permite analisar quantidades de pesticidas da ordem de centenas de forma rápida e usando ainda pouco solvente orgânico, de onde vem o seu apelo como um método alinhado dentro da tendência de química verde (GONZÁLEZ-CURBELO; VARELA-MARTÍNEZ; RIAÑO-HERRERA, 2022).

E como ressaltado em seu nome, o QuEChERS é reconhecido como um método rápido. Isso porque ele é constituído somente por dois passos: uma extração com solvente orgânico e um processo rápido de *clean-up* chamado de extração em fase sólida “dispersiva”. A extração com solvente é feita após a homogeneização da amostra. Originalmente, essas amostras se restringiam a frutas e vegetais, caracterizando uma extração sólido-líquido. Contudo, atualmente, o QuEChERS é aplicado para inúmeros tipos de amostra, como sangue menstrual, plasma, soro, urina, fluidos orais, sangue total, entre outros (ASON; ARMAH; ESSUMANG, 2022; DA SILVA et al., 2023; JIANG et al., 2022; DI TRANA et al., 2024). Uma das opções mais empregadas de solvente orgânico (pequena quantidade, em torno de 15mL) é o MeCN (ou ACN, acetonitrila), considerada melhor do que acetona e acetato de etila. A ACN tem como vantagens, além de ser solúvel em água e ter grande capacidade de interação com a amostra, extrair uma *ampla faixa de analitos* deixando para trás muitos interferentes lipofílicos da amostra. A etapa de extração também envolve o emprego de sais, como o  $MgSO_4$  e  $NaCl$ , capazes de promover efeito *salting-out* contribuindo tanto para a separação de fases e na migração do analito para a fase orgânica quanto na ajuda em remover resíduos de água na fase orgânica, o que poderia levar à extração de uma série de interferentes polares. O uso desses sais de forma combinada mostra resultados melhores do que sozinhos ou ainda em relação a outros tipos de sais ( $LiCl$ ,  $NaNO_3$ ,  $Na_2SO_4$  etc) (VARELA-MARTINEZ et al, 2020).

Depois deste processo de extração, a mistura é centrifugada e uma alíquota submetida à extração em fase sólida “dispersiva” (dSPE) para um *clean-up* final antes da transferência da amostra para a coluna de separação. O sorvente originalmente empregado é do tipo PSA (amina primária secundária) em quantidades de 25 mg aproximadamente (não exigindo cartuchos ou pré-condicionamento), em conjunto com alguns miligramas de  $MgSO_4$  para remoção de traços de água e interferentes de matriz polares. Uma alíquota retirada após a dSPE poderia ser injetada diretamente nos sistemas de cromatografia (VARELA-MARTINEZ et al, 2020).

Ao longo dos anos, o método foi sofrendo alterações para otimização frente à extração de diversos tipos de analitos e amostras que não fossem apenas alimentos, demonstrando a sua versatilidade. Em essência, os principais alvos de modificação são o tipo e quantidade de solvente utilizado na etapa de extração, ou proporção da mistura de solventes; os sais que serão usados para promoção do efeito *salting-out* (e suas proporções); assim como os materiais sorventes e o sal utilizado na etapa da dSPE. Assim, podemos perceber que cada uma das etapas do método apresenta fatores passíveis de otimização e que podem culminar em melhores resultados ao final da análise. Além disso, a realização de algumas etapas com tamponamento facilita a análise de analitos sensíveis a pHs extremos, algo que não foi proposto no QuEChERS original (PERESTRELO et al., 2019). Uma tendência recente, por exemplo, tem sido a aplicação de materiais porosos em substituição às aminas primárias secundárias (ELATTAR; KAMAL EL-DEEN, 2024).

Chen e colaboradores desenvolveram um método com preparo de amostra baseado em QuEChERS e LC-MS/MS para a identificação e quantificação de resíduos de fármacos diuréticos em diferentes alimentos, empregando amostras de músculos porcino, bovino, caprino, de coelho, ovos e leite adquiridos de vários fornecedores desses alimentos. As amostras (2g) foram cominuídas e adicionadas de padrão interno, seguido da adição de acetonitrila (15mL) e homogeneização em vortex e adição de  $Na_2SO_4$ , também seguida por homogeneização em vortex. Essa mistura foi centrifugada e uma alíquota do sobrenadante transferida para um tubo contendo PSA, C18 e  $MgSO_4$ . Por fim, essa mistura foi homogeneizada em vortex e centrifugada, sendo o sobrenadante submetido a um processo de evaporação do solvente pela aplicação de um fluxo gentil de nitrogênio (em banho a 40°C) e havendo a ressuspensão em uma mistura de acetonitrila e água. As faixas lineares

das curvas de calibração foram 0.5–50 µg/kg para dois diuréticos e 0.25 to 25 µg/kg para o restante (CHEN et al., 2021).

Rodrigues e colaboradores realizaram a técnica de micro-QuEChERS (levemente diferente do original) para o preparo de amostra de sangue *post-mortem* para a determinação de 28 fármacos psicotrópicos. As amostras foram posteriormente submetidas à análise por LC-MS/MS. O micro-QuEChERS foi conduzido utilizando-se 100µL de sangue, 30µL de acetonitrila, 100µL de água ultrapura e 100mg de uma mistura de sais composta por sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e acetato de sódio (NaO<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>). A mistura foi homogeneizada e centrifugada, seguido da coleta de uma alíquota do sobrenadante para injeção direta do sistema de LC-MS/MS. A faixa de linearidade da curva de calibração foi entre 1ng/mL e 500ng/mL, de modo que o método pôde ser aplicado com sucesso em 100 amostras autênticas de sangue *post-mortem* (RODRIGUES et al., 2021).

#### **4.2 Separação e detecção**

Como mencionado anteriormente, quando se fala na análise de moléculas pequenas presentes em baixa concentração (muitas vezes, traços) em matrizes biológicas como sangue, plasma ou soro, a LC-MS/MS é considerada a mais versátil instrumentação analítica utilizada na atualidade. Na prática clínica de monitorização terapêutica de drogas oncológicas, por exemplo, o uso da LC-MS/MS é uma realidade constante devido ao fato de possibilitar a análise de inúmeros ativos ao mesmo tempo e ser mais seletiva e sensível do que os métodos baseados em LC-UV (ADAWAY; KEEVIL, 2012; MIURA; TAKAHASHI, 2016). Além disso, são superiores também aos métodos baseados em imunoenaios, que apresentam normalmente problemas relacionados a reações cruzadas e grande variabilidade entre fabricantes, além de faixas lineares de calibração menores (DASGUPTA, 2016; ZHANG; ZHANG, 2018). Portanto, as metodologias de LC-MS/MS são mais atrativas para a bioanálise de fármacos no sangue. Inclusive, na farmacotoxicologia, a LC-MS/MS é considerada método de escolha mesmo quando não existem evidências de outros métodos para comparação (D'OVIDIO et al., 2023; VISCONTI et al., 2023).

Ao fazer uma busca no período de 2019-2024 na base de dados PubMed, utilizando a combinação de descritores e operadores “drug (and) plasma (and)

lc-ms/ms”, foram apresentados 1.421 resultados. Utilizando a combinação “drug (and) plasma (and) gc-ms”, são mostrados apenas 242 resultados. Ou seja, nota-se uma predominância forte da LC em relação a outros métodos de separação (no caso exemplificado, a GC).

A cromatografia líquida empregada na bioanálise normalmente é realizada na forma de HPLC, ou seja, de cromatografia líquida de alta eficiência. Sem dúvidas, a maior vantagem da HPLC, contrastando diretamente com a maior desvantagem da GC, e que pode explicar o fato de ela ser tão mais usada nos estudos publicados, é a sua vastidão de aplicações com relação aos tipos de analitos que podem ser analisados e sua “praticidade”. Collins, Braga e Bonato, em seu livro, elencam como vantagens da GC as separações robustas com maior rapidez (embora a LC seja também muito rápida), além de sua instrumentação ser geralmente mais fácil de ser operada (exige menos treinamento e prática do analista). Ademais, afirmam que sua capacidade analítica em termos de quantidade de compostos analisados pode ser superior à do HPLC (COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S, 2006). Em contrapartida, Kang considera que, apesar de ser muito útil e extensamente empregada para análises altamente sensíveis e específicas de analitos termoestáveis e até certas massas, o manuseio da instrumentação relativa à GC é muito dispendioso e demorado, os preparos de amostra são laboriosos quando há necessidade de derivatização dos analitos, e as corridas podem ser longas, com capacidade inferior a 50 amostras por dia (KANG, 2012). Em um trabalho mais recente, Garcia e colaboradores afirmam que dentro do contexto de determinação de compostos endógenos e exógenos em amostras biológicas, os métodos de separação baseados em GC e CE (*capillary electrophoresis*), ou mesmo cromatografia por fluido supercrítico, são menos utilizadas do que a LC por conta de desvantagens instrumentais ou metodológicas (GARCIA et al., 2021).

A necessidade de mudança de fase do analito é um fator altamente limitante da GC, já que nem toda molécula de fármaco é volátil ou termorresistente. E para empregar a GC nesses casos, é preciso realizar etapas de derivatização para transformar a estrutura original do analito em uma estrutura que suporte o estresse térmico promovido pela GC, que é muito maior do que o da HPLC. Assim, os métodos envolvendo cromatografia líquida acabam rendendo um espectro mais amplo de aplicações, já que com eles não se encontra esse tipo de obstáculo. Normalmente, para aplicação de métodos de separação e detecção GC-MS/MS, são

feitas reações de derivatização pré-coluna *off-line* como parte do preparo de amostra antes de ela ser injetada na coluna. Mas, esse processo pode ocorrer de forma *on-line* após a passagem da amostra pela coluna, ocorrendo antes que o analito encontre o detector do espectrômetro de massas (C. MOLDOVEANU; DAVID, 2019).

Em linhas gerais, os cromatógrafos à líquido operam envolvendo o uso, além da coluna cromatográfica, de bombas de alta pressão, sistemas de injeção de amostra e detectores. Uma vez injetadas, as amostras pré-tratadas são eluídas com a fase móvel, que é bombeada com alta pressão. Assim, a bomba do sistema faz com que a fase móvel arraste a amostra para a coluna com alta pressão e os componentes sejam eluídos ao longo dela, devendo chegar separados no detector. Essa separação ocorre com base nas diferenças de velocidade de eluição, que por sua vez, derivam da força de interação do analito com a fase móvel e a fase estacionária, o que determinará se ele ficará mais ou menos retido. O sistema de aquisição de dados fornece então o cromatograma (gráfico contendo os picos de sinal de cada molécula *versus* tempo de retenção na coluna). Em um cromatograma ideal, cada pico corresponde a uma substância diferente, porque não ocorre coeluição (duas ou mais substâncias migrando com a mesma velocidade). Na cromatografia líquida, a fase estacionária (ou recheio da coluna), é um material sólido ou adsorvido a um suporte sólido empacotado no interior da coluna. As interações entre analito e fase estacionária podem ser dos mais diversos tipos, e podem ser exploradas em favor do tipo de separação desejada. Assim, existem colunas cromatográficas com diferentes recheios, permitindo classificar as cromatografias líquidas conforme vários princípios de separação. Elas podem ser do tipo líquido-sólido ou por adsorção; líquido-líquido ou por partição; exclusão de tamanhos, troca iônica, bioafinidade ou quiral (COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S, 2006).

A grande maioria das colunas cromatográficas são recheadas com partículas de sílica empacotada (cujas partículas podem ter diferentes tamanhos, formatos e porosidades) e cuja principal interação do analito com a fase estacionária é por adsorção (ligações de hidrogênio e interações dipolo induzido-dipolo). Também existem fases estacionárias líquidas depositadas no recheio (suporte) da coluna, quando a separação dos analitos se dá por partição (diferença de solubilidade do analito na fase móvel e na fase estacionária) (COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S, 2006).

As fases quimicamente ligadas a suportes sólidos, uma modalidade muito comum de HPLC, são classificadas em cromatografia de fase normal ou reversa. A fase normal utiliza colunas com fase estacionária mais polar do que a fase móvel (grupos amino, nitrilo ou diol). Quando classificada como fase reversa, os grupos funcionais que interagem com o analito costumam ser apolares (como C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, e fenil) e a fase móvel é mais polar do que a fase estacionária. Ela é o tipo de HPLC mais empregada para as separações, porque tem uma capacidade de aplicação bastante vasta, sendo eficiente na separação de analitos com polaridades e massas moleculares diversas (DEVANSHU et al., 2010).

A cromatografia de troca iônica, por sua vez, emprega fases estacionárias contendo grupos funcionais iônicos (sulfônicos, carboxílicos) ligados a um suporte sólido. A interação do analito com a fase estacionária se dá pelo deslocamento do par iônico desses grupos funcionais. E a cromatografia por exclusão tem como mecanismo de separação a diferença de tamanho entre as moléculas de analitos que conseguem adentrar mais ou menos nos poros da fase móvel (COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S, 2006). Contudo, vale ressaltar que as fases móveis empregadas na cromatografia de troca iônica e de exclusão de tamanhos normalmente são menos compatíveis com os detectores por espectrometria de massas, sendo a bioanálise de pequenas moléculas predominantemente respaldada pelas fases reversas (GORITYALA; ROOS; DONG, 2021).

Um fato interessante é que tanto a cromatografia de troca iônica quanto a de exclusão são muito direcionadas dentro do meio analítico para a separação de proteínas e peptídeos, sendo portanto, mais empregadas dentro do campo das moléculas biológicas (GOYON et al., 2018; LIANG; FIEG; JAKOBTORWEIHEN, 2014).

Uma variação do HPLC bastante utilizada também atualmente é a cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês UPLC, *Ultra Performance Liquid Chromatography*). Sua diferença para o HPLC está no fato de que ela usa de recheios de coluna com tamanho de partícula de cerca de 2 µm, enquanto que as partículas na HPLC costumam ter tamanho de aproximadamente 5 µm. A redução no tamanho da partícula proporciona maior capacidade de separação dos picos do cromatograma, aumentando a eficiência de separação do método. Além disso, os cromatógrafos para UPLC normalmente possuem bombas com maior capacidade de

produzir pressão, pois a pressão requerida para esse tipo de sistema é maior, o que ajuda a melhorar também a eficiência de separação (GUMUSTAS et al., 2013).

A cromatografia líquida de interação hidrofílica (do inglês HILIC, hydrophilic interaction liquid chromatography) é uma técnica que merece destaque no sentido de empregar fases estacionárias polares para a separação de pequenos analitos polares, ao contrário do que normalmente acontece devido ao grande emprego das fases reversas. Nesse sentido, a HILIC é semelhante a uma cromatografia líquida de fase normal. A diferença está no fato de que embora utilize fases estacionárias polares semelhantes às da cromatografia de fase normal, a fase móvel também é polar (semelhante às das cromatografias de fase reversa). Trata-se de um tipo de cromatografia aplicável para compostos que são polares demais para serem retidos pela cromatografia líquida de fase reversa porém não são iônicos, e portanto não seriam bem separados pela cromatografia de troca iônica. As fases estacionárias normalmente são feitas de sílica ou sílica gel, modificadas com grupos funcionais polares, além de fases estacionárias poliméricas. As fases móveis geralmente são compostas de água e acetonitrila (ou qualquer outro solvente orgânico aprótico miscível em água), bem como alguns aditivos para regulação de pH e força iônica. Para esse tipo de cromatografia, acredita-se que o mecanismo predominante de separação seja a partição das moléculas polares de analito entre a fase móvel rica em acetonitrila e a camada de água imobilizada sobre a fase estacionária hidrofílica. Assim, quanto mais polar, mais o analito seria capaz de migrar para essa camada de água, ficando retido. Entretanto, são elencadas como formas de interação do analito com a fase estacionária ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas fracas, fazendo com que a HILIC seja mais do que apenas sobre separação baseada em particionamento (BUSZEWSKI; NOGA, 2012).

Por fim, é oportuno dizer que a espectrometria de massas sequencial, ou em *tandem*, utiliza dois analisadores de massa na detecção, o que costuma ser mais seletivo do que empregando apenas um. Ainda, é vantajoso pois aumenta a detectabilidade, ajuda a reduzir a interferência de outros compostos da matriz, além de permitir explorar de forma mais ampla a estrutura dos analitos. E sua maior seletividade é atribuída ao modo de operação *multiple reaction monitoring (MRM)/selected reaction monitoring (SRM)*, utilizado sobretudo para fins de *quantificação*. Nesse modo, um íon precursor (de uma determinada razão m/z escolhida dentro das possibilidades de varredura de potenciais dos eletrodos

quadrupolares) é selecionado por um analisador de massa quadrupolar na função de filtro de massas e depois submetido a uma ou mais fragmentações dentro de uma câmara de colisão (que pode ser, em vez de um segundo quadrupolo, um hexapolo). A seleção do íon pelo primeiro quadrupolo ocorre por meio da estabilização de sua trajetória em função do estabelecimento de um campo elétrico específico, fazendo com que ele chegue à câmara de colisão. Nesta, o íon de razão  $m/z$  selecionado é fragmentado pela colisão com moléculas de um gás inerte e os fragmentos formados passam por um outro analisador de massas quadrupolar também na função filtro de massas, selecionando o fragmento desejado, ou seja, selecionando o fragmento de razão  $m/z$  que deve chegar ao detector por meio da escolha de uma combinação de potenciais específicos (RUHAAK; LEBRILLA, 2015).

Esse tipo de abordagem evita que dois íons precursores que possuam a mesma razão  $m/z$  sejam interpretados como sendo o mesmo analito, conferindo ao método muita seletividade por meio do monitoramento das transições de massa dos analitos.

### **4.3 Outras técnicas de separação, identificação e quantificação**

A eletroforese capilar (do inglês CE, *capillary electrophoresis*) é um outro método de separação, além do HPLC e GC, que também ocupa espaço dentro do meio bioanalítico. A instrumentação da CE é essencialmente composta por um capilar, podendo ser preenchido com polímero ou outros materiais, e banhado em seu interior por uma solução eletrolítica. A movimentação da amostra dentro do capilar, assim que injetada, ocorre pela presença de um *fluxo eletrosmótico* (gerado pelo movimento ordenado dos íons da solução eletrolítica sob ação de um campo elétrico de alta voltagem). Uma de suas vantagens é que é uma técnica viável pelo fato de os capilares serem baratos e fáceis de se fabricar (MARINA; RÍOS; VALCÁRCEL, 2005). Swiadro e colaboradores desenvolveram um método baseado em eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS) para a determinação de antidepressivos tricíclicos, benzodiazepínicos, hipnóticos e inibidores seletivos da recaptação de serotonina em amostras gotas de sangue seco coletadas *in vivo* ou *post-mortem*. As curvas de calibração foram construídas dentro de faixa linear de quantificação de 50ng/mL até 300ng/mL para cada um dos fármacos (ŚWIADRO et al., 2020).

A CE é uma técnica que apresenta boa resolução, rápida e faz baixo consumo de amostras e reagentes. e colaboradores aplicaram a CE acoplada a um detector por arranjo de diodos (CE-DAD) para análise de Piperacilina, Tazobactam e Ibuprofeno em plasma de ratos para um estudo farmacocinético. A faixa linear de quantificação obtida pelo método foi de  $1\mu\text{g/mL}$  a  $200\mu\text{g/mL}$  (OTHMAN et al., 2024).

Conforme exibido até o momento, embora o massas seja o tipo de detector mais sensível, temos outros tipos que são bastante apropriados para a detecção de fármacos, dependendo de suas características, na matriz sanguínea. Sabe-se que um detector é um instrumento que percebe a presença de um eluente (por diferentes mecanismos) e envia um sinal elétrico que é registrado na forma de um cromatograma. Idealmente, algumas características são desejáveis para um detector: alta sensibilidade, resposta linear, estabilidade, reprodutibilidade, confiabilidade, facilidade de manuseio, não ser destrutivo e seletividade (COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S, 2006).

Os detectores UV-Vis são bastante úteis e podem ser aplicados para a detecção substâncias que possuem grupos cromóforos na região do visível, podendo variar na cobertura do espectro que oferecem. Um dos tipos mais comuns de detectores UV-Vis é a rede de diodos (ou arranjo de diodos, DAD, *diode array detector*). Esse detector permite que toda a luz emitida que passa pela amostra seja armazenada e transduzida por fotodiodos, assim é possível gerar vários espectros diferentes para cada substância, contribuindo para que o analista possa selecionar os comprimentos de onda de melhor sensibilidade para as substâncias. Vosough e Tehrani desenvolveram um método analítico baseado em HPLC-DAD, ou seja, HPLC acoplado a detector de arranjo de diodos, para a determinação de 3 fármacos imunossupressores (Tacrolimus, Everolimus e Ciclosporina) no sangue total, com faixas lineares de  $2,1\mu\text{g/L}$  -  $63\mu\text{g/L}$  para o Tacrolimus,  $2,4\mu\text{g/L}$ – $200\mu\text{g/L}$  para o Everolimus e  $36\mu\text{g/L}$ – $1250\mu\text{g/L}$  para a Ciclosporina (VOSOUGH; TEHRANI, 2018). Puszkiel e colaboradores, por sua vez, utilizaram método de HPLC-UV para a quantificação de Enzalutamida (droga anticâncer, inibidor da via de sinalização dos receptores androgênicos e inibidor competitivo da Diidrotestosterona) no plasma, com curva de calibração na faixa linear de  $0,50\mu\text{g/mL}$  –  $50,0\mu\text{g/mL}$  tanto para a Enzalutaida quanto seu metabólito N-desmetil Enzalutamida (PUSZKIEL et al., 2017).

Em linhas gerais, entende-se que o detector de UV-Vis é economicamente mais viável, porém, é menos seletivo e exige por vezes que o analito esteja em concentrações maiores na amostra, em função de sua menor sensibilidade, sendo bastante utilizado na monitorização terapêutica de fármacos anticâncer, uma vez que estes são normalmente administrados em concentrações relativamente altas. Já os detectores de fluorescência são aplicados para leitura de sinal de compostos que apresentam grupos fluorescentes (fluoróforos), sendo bastante seletivos e mais sensíveis. Permitem também a análise de diversos analitos ao mesmo tempo (TUZIMSKI; PETRUCZYNIK, 2020). Como exemplo da sensibilidade atingida pelos métodos baseados em detecção por fluorescência, temos o trabalho desenvolvido por Treder e colaboradores. O grupo criou um método baseado em HPLC-FL para a detecção de Epirrubicina (uma das drogas anticâncer mais efetivas e empregadas na terapêutica) na urina e plasma de pacientes, sendo a faixa linear de concentrações quantificáveis pelo método, nestas duas matrizes, sendo os valores de limite de detecção e quantificação iguais a 0,25 ng/mL e 0,5 ng/mL, respectivamente (TREDER et al., 2020).

Os detectores eletroquímicos, por sua vez, são baseados na capacidade que os compostos possuem de serem oxidados ou reduzidos quando entram em contato com um potencial elétrico. Essas reações de oxidação ou redução são responsáveis por gerar uma corrente elétrica dentro da cela, cuja intensidade pode ser medida pelo detector e é justamente proporcional à quantidade daquele composto que está passando pela cela. E por fim, os detectores por índice de refração são universais na medida em que não exigem nenhuma característica específica das moléculas que estão sendo analisadas, bastando que elas possuam índice de refração diferente da fase móvel. O princípio de funcionamento deste detector é a alteração do índice de refração da fase móvel quando um analito passa pelo detector. É um detector de baixa sensibilidade, e que não pode ser utilizado em eluição por gradiente ou com mudanças de temperatura (pois o IR depende da temperatura) (ARGENTON, 2010).

Segundo Stokvis e colaboradores, o detector de massas, ainda assim, é mais seletivo e sensível do que o UV-Vis, e pode ser aplicado a um grupo muito maior de compostos do que os detectores por fluorescência e eletroquímicos. Tanto os detectores por fluorescência quanto os eletroquímicos estão restritos aos compostos

que apresentam fluoróforos ou grupos eletroativos (STOKVIS; ROSING; BEIJNEN, 2005)..

Assim, considerando uma situação hipotética em que seja necessário fazer a determinação em matriz biológica de uma molécula que não apresenta cromóforo nem fluoróforo, porém empregando um baixo limite inferior de quantificação e considerável seletividade, e essa molécula possuir problemas com a detecção por espectrometria de massas, uma alternativa possível é a realização de reações de derivatização para fazer com que ela adquira um grupo fluoróforo (JANKECH et al., 2024).

#### **4.4 Desafios de bioanálise de diferentes fármacos**

Um ponto relevante acerca da determinação quantitativa de fármacos no sangue (e em outros tipos de matrizes biológicas também), é que a faixa de concentração do analito influencia na performance do método. Sichilongo e colaboradores realizaram várias de técnicas de preparo de amostra para a determinação das quantidades de antirretrovirais no plasma humano. Os métodos foram comparados e os resultados mostraram que as eficiências de extração muitas vezes são dependentes da concentração de fármaco disponível na amostra (SICHILONGO et al., 2018). Ou seja, uma determinada concentração de fármaco pode tornar mais difícil o preparo de amostra, dificultando a sua extração e recuperação.

Além disso, as características físico-químicas das moléculas que se deseja determinar são muito importantes. Nesse contexto, os autores Tuzimski e Petruczynic trazem grandes contribuições para o entendimento de quais são os principais tipos de métodos (especialmente no que diz respeito à escolha do detector) para várias classes de medicamentos. Segundo eles, durante o monitoramento de fármacos imunossupressores, é preciso ficar atento a questões como o tipo de órgão transplantado, período do transplante, idade do paciente e comedicações, pois todos esses fatores podem afetar a janela terapêutica (faixa de concentrações entre a mínima para se ter efeito e a máxima sem grandes efeitos colaterais ou tóxicos), a qual costuma ser estreita. A detecção pode ser feita por HPLC acoplados a detectores UV-Vis, porém o método de escolha para a quantificação desses tipos de fármacos é o LC-MS ou LC-MS/MS. Os ativos anticâncer são comumente administrados em alta concentração aos pacientes,

estando em níveis relativamente altos na grande maioria deles, porém suscetíveis às variações intrapessoais de farmacocinética. É comum que esses fármacos sejam identificados e quantificados por detectores UV-Vis (pois não é exigido dos métodos tanta sensibilidade), de fluorescência e espectrometria de massas. Para a determinação dos analitos que não contém cromóforos nem fluoróforos fortes, a derivatização é uma das estratégias adotadas. A maioria dos antibióticos em amostras de plasma é determinada por HPLC-UV, entretanto, raramente por métodos HPLC-FL. A análise de fármacos envolvidos na linha de tratamento de tuberculose (vários antibióticos juntos) é predominantemente feita por LC-MS/MS, justamente por sua grande capacidade de detectar vários analitos ao mesmo tempo. Algumas outras classes abordadas por eles são os fármacos cardiovasculares, psicotrópicos e antiepilépticos. A determinação dos fármacos cardiovasculares é principalmente realizada por HPLC-FL e LC-MS/MS. Os psicotrópicos, por sua vez, são fármacos muitos dos quais apresentam grupos cromóforos em sua estrutura. Dessa forma, a detecção por UV-Vis é uma alternativa bastante empregada. HPLC-FL é especialmente empregada para a determinação de Fluoxetina. A detecção eletroquímica é empregada também, mas a mais utilizada, como de costume, é a por espectrometria de massas por meio dos métodos de LC-MS/MS. A determinação de fármacos antiepilépticos, por sua vez, está fortemente associada a HPLC-UV e HPLC-DAD, sendo um pouco menos realizada por LC-MS/MS do que nas outras classes de fármacos citadas até o momento (TUZIMSKI; PETRUCZYNIK, 2020).

## **5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA**

### **5.1 Tipos de validação analítica**

Para aplicar um método bioanalítico, seja no contexto de estudos farmacocinéticos ou toxicocinéticos, estudos de bioequivalência ou monitorização terapêutica, é necessário que o analista possa confiar nos resultados que são gerados pelos métodos empregados. A validação é a forma pela qual é possível provar que o método cumpre o que promete, realizando aquilo à que se destina. Segundo a RDC da Anvisa nº 27, de 2012, a validação de métodos bioanalíticos é a confirmação por ensaio e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (BRASIL, 2012).

Os desafios relacionados à validação dependem do tipo de método empregado e suas finalidades. Transferências de tecnologia entre laboratórios normalmente não exigem um processo de validação completo. Entretanto, todo método recém desenvolvido precisa passar por um processo de validação para que possa ser utilizado, principalmente considerando que toda situação de uso de bioanálise pode ter um impacto na decisão legal de registro (reunindo dados analíticos que vão desde a condução dos estudos não clínicos e clínicos até dados de biodisponibilidade relativa de fármacos no sangue) até o ajuste de dose em pacientes. Além disso, a validação de métodos é parte do sistema de qualidade *GLP* (*Good Laboratory Practices*), isto é, do conjunto de Boas Práticas de Laboratório (BPL) (MOEIN; EL BEQQALI; ABDEL-REHIM, 2017).

A validação total é feita tanto para métodos recém desenvolvidos quanto em situações de inclusão de um novo fármaco ou metabólito que se deseja identificar e quantificar. Já a validação parcial é aplicada em situações em que mudanças pequenas são realizadas em um método já validado, como em casos de transferência de tecnologia entre laboratórios, mudanças na faixa de concentração da espécie na amostra, alteração do volume de amostra ou mudança nas condições de armazenamento. O terceiro tipo de validação é a cruzada, que deve acontecer quando se deseja comparar resultados provenientes de diferentes métodos em um mesmo estudo ou resultados do mesmo método sendo aplicado em diferentes laboratórios. De forma geral, pode-se dizer que não existe uma regra para quais parâmetros devem ser avaliados na validação parcial. Assim, ela pode ser desde uma análise rápida de precisão e exatidão até quase uma validação total. Cabe ao analista entender sobre o seu processo e decidir que tipo de parâmetros podem ser impactados pelas mudanças realizadas no método. Algumas questões existem com relação ao tipo de matriz e espécie doadora dessa matriz. Assim, se um método é validado para o sangue total de camundongos, ele precisa passar por uma validação parcial para ser aplicado em amostras de sangue de macacos, por exemplo (FDA, 2018; GONZÁLEZ; ALONSO, 2020).

## **5.2 Parâmetros empregados para a validação**

Os parâmetros empregados para a validação de métodos bioanalíticos são: (1) seletividade, (2) especificidade, (3) *carryover*, (4) limite inferior de quantificação (ou sensibilidade), (5) curva de calibração ou curva analítica, (6) precisão, (7)

exatidão, (8) integridade de diluição, (9) efeito de matriz, (10) recuperação e (11) estabilidade (EMA, 2011; BRASIL, 2024).

A seletividade é o parâmetro que diz respeito à capacidade do método bioanalítico de diferenciar e medir o analito dentro de uma matriz branco, que está repleta de substâncias potencialmente interferentes. A especificidade complementa essa visão na medida em que é entendida como a capacidade de diferenciar o analito de outras substâncias, inclusive aquelas com características muito parecidas com as do analito. Assim, deseja-se que o método seja capaz de diferenciar o analito das impurezas da matriz, metabólitos, produtos de degradação etc (DESHPANDE, M. et al, 2016). O estudo da seletividade do método cromatográfico é feito a partir de 6 diferentes lotes de matrizes, ou seja, 6 matrizes branco (processadas mas sem adição de analito e padrão interno) de diferentes fontes. A Anvisa recomenda a investigação da seletividade do analito em pelo menos uma matriz hemolisada, o que pode ser feito pela adição de sangue total hemolisado para gerar pelo menos uma amostra com essas características. Recomenda-se também que isso seja feito com uma amostra lipêmica. Da mesma forma, se esta matriz for de difícil obtenção natural, podem ser adicionados triglicerídeos em uma amostra para transformá-la em lipêmica. A avaliação de matrizes lipêmicas não é necessária para estudos não clínicos. Uma vez que os resultados obtidos são positivos, o que ocorre quando os sinais atribuíveis ao analito e padrão interno (PI) - que pode ser gerado tanto por moléculas interferentes da matriz que migram no mesmo tempo que o analito e o PI, e produzem o mesmo tipo de transição de massas que eles ou ainda, por uma contaminação com o analito e PI em certo nível - obtidos nas matrizes branco processadas não ultrapassam 20% do valor do limite inferior de quantificação e 5% do sinal do padrão interno. Desse modo, o método é considerado tão mais seletivo quanto menores forem os sinais obtidos no teste de seletividade (FDA, 2018; GONZÁLEZ; ALONSO, 2020; BRASIL, 2024).

A especificidade pode ser investigada na medida em que é comprovada a existência de metabólitos capazes de se retroconverter ao analito, por exemplo. E embora muitas vezes não sejam possíveis nos estágios iniciais da validação, caso essa retroconversão ocorra, sua extensão deve ser documentada e os impactos disso nos resultados do método discutidos no relatório de validação (BRASIL, 2024).

Essa dificuldade no reconhecimento de um analito em meio a todos os elementos componentes de uma matriz biológica está relacionada com o efeito de

matriz. Uma forma de medir esse tipo de efeito para fins de validação é por meio do cálculo de fatores de matriz. Este cálculo é importante para o conhecimento do desempenho do método, mas não necessariamente precisa ser feito durante os procedimentos de validação, podendo ser realizado também em etapa de pré-validação ou durante o desenvolvimento do método em si (GONZÁLEZ; ALONSO, 2020).

O fator de matriz é calculado pela razão entre o pico do analito na presença de íons de matriz (branco adicionado do analito após procedimento de extração) e o pico do analito na ausência de matriz (solução padrão pura). Se a razão for 1, isso significa que não há efeito de matriz. Se menor do que 1, há efeito de supressão iônica, e se maior do que 1, há efeito de aumento iônico. Caso seja empregado padrão interno para a quantificação deste fator, é calculado o NMF (fator de matriz normalizado), ou seja, o fator de matriz do analito é dividido pelo fator de matriz do padrão interno. O mais preocupante não é o efeito de matriz em si (normalmente fica entre 0,8 e 1,2), mas sim a variação que ele pode ter entre diferentes lotes de matrizes. Se a variação entre lote for muito alta, o método não é confiável por não haver reprodutibilidade (GONZÁLEZ; ALONSO, 2020).

O Guia nº72/2024 da Anvisa recomenda que o efeito de matriz seja avaliado por 3 amostras de controle de qualidade baixo (iguais a 3 vezes o valor do limite inferior de quantificação) e 3 amostras de controle de qualidade alto (75% da concentração do limite superior de quantificação). Cada uma delas deve ser produzida a partir de um lote de matriz de fonte diferente, sendo utilizados 6 lotes de matriz no total. A exatidão deve estar dentro de  $\pm 15\%$  da concentração nominal e a precisão ou coeficiente de variação percentual (CV) não deve ser superior a 15%. É recomendada também a avaliação adicional de amostras de matrizes de sangue lipêmico e hemolisado, especialmente quando essas condições são esperadas de serem encontradas durante a aplicação do método (BRASIL, 2024).

*Carryover* é o nome dado ao efeito resultante da sobra de resíduos de uma análise anterior, que impactam nos resultados da análise presente na medida em que podem ajudar a reduzir a exatidão e a precisão e aumentar o limite inferior de quantificação, devido à presença de concentração residual do analito. Mas não necessariamente o efeito de *carryover* acontece somente em análises subsequentes. Na realidade, uma certa quantidade de analito acumulada na coluna pode causar impacto em uma análise posterior após a realização de várias análises

entre elas. Portanto, não é uma regra que a amostra anterior sempre será responsável por gerar efeito de *carryover* na subsequente. Como forma de amenizar esses efeitos, é comum analisar as amostras menos concentradas no analito antes das mais concentradas, porque com isso a quantidade de resíduo é menos significativa diante da quantidade concentração de analito da amostra subsequente, gerando impacto menor (GONZÁLEZ; ALONSO, 2020).

O estudo do efeito de *carryover* é feito por meio da injeção e análise da amostra de padrão de calibração contendo a maior concentração antes da corrida de uma amostra de matriz branco (não contém analito, apenas a matriz). A concentração de analito detectada na amostra de matriz branco não deve exceder 20% do limite inferior de quantificação ou 5% na resposta do padrão interno (EMA, 2011; GONZÁLEZ; ALONSO, 2020).

O limite inferior de quantificação (do inglês LLOQ, *lower limit of quantification*) é a menor concentração de analito que o método é capaz de analisar com precisão e exatidão. O LLOQ pode ser entendido também como o primeiro ponto da curva de calibração, e deve ser validado pelos testes de precisão e exatidão intracorrída e intercorrída (BRASIL, 2024).

A curva de calibração ou curva analítica é a equação matemática que descreve a resposta dada pelo método à presença do analito, e ela deve ficar entre o limite inferior de quantificação e o limite superior de quantificação. De acordo com o Guia para a Indústria de Validação de Métodos Bioanalíticos, a curva de calibração deve ser composta por pelo menos um branco (apenas a matriz), zero (matriz com padrão interno) e 6 amostras contendo padrão analítico em concentrações conhecidas que serão responsáveis por fornecer a faixa da curva analítica. É de extrema importância que todos os brancos e pontos de calibração sejam preparados na mesma matriz das amostras que serão utilizadas (FDA, 2018).

As amostras de controle de qualidade (CQ), ou padrões de validação, são amostras usadas para avaliar a exatidão e a precisão de um método, e que para isso tentam mimetizar condições reais. Justamente por isso não são usadas as concentrações empregadas para fazer a curva analítica (ou seja, as concentrações dos padrões de calibração), já que em uma situação rotineira as concentrações do analito não são exatamente iguais às dos pontos usados para construir a curva. As amostras de CQ são feitas em 4 níveis de concentração pelo menos. Os nomes dados pelo Guia nº72/2024 da Anvisa a cada uma delas é: LLOQ - sendo esta igual

ao limite inferior de quantificação; CQB - dentro de 3 vezes o valor do LLOQ; CQ médio ou CQM - dentro de 30-50% da faixa da da curva de calibração; e o CQA - pelo menos 75% do limite superior de quantificação (BRASIL, 2024).

A exatidão e precisão, por sua vez, podem gerar certa confusão pela forma como são tratados por diferentes autores. Rozet e colaboradores mostram uma visão de que a exatidão é entendida no campo analítico como a soma ou combinação dos erros sistemáticos (citados como *trueness*, ou “veracidade” do método) e erros aleatórios (precisão), portanto, é entendida como erro total que uma medida pode apresentar em relação ao valor nominal (ROZET et al., 2011). No entanto, Raposo e Ibelli-Bianco consideram que a terminologia exatidão originalmente se refere apenas ao erro sistemático, não sendo uma função resultante da soma de dois tipos de erros (RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020).

A precisão, por sua vez, mostra a dispersão dos valores obtidos pelo método para um dado valor real de concentração, permitindo ter a noção se estes valores são mais próximos entre si ou variam muito (ROZET et al., 2011).

Experimentalmente, exatidão e precisão devem ser obtidas dentro de uma mesma corrida analítica ou entre corridas analíticas. Para avaliar esses parâmetros de forma intracorrída, são empregadas 5 réplicas de cada ponto amostra de controle de qualidade. Assim, a exatidão corresponde ao erro relativo da média das 5 réplicas para pelo menos 4 níveis de concentração em relação ao valor nominal de concentração de cada amostra de CQ, devendo este valor médio ser  $\pm 20\%$  do valor nominal para o LLOQ e  $\pm 15\%$  do valor nominal de todos os outros pontos de CQ. Para avaliar a exatidão intercorrida, são realizadas 3 corridas analíticas em pelo menos dois dias diferentes, onde os valores obtidos para cada ponto dos CQs será comparado entre as corridas, seguindo a mesma regra de o erro estar dentro de  $\pm 20\%$  do valor nominal para o LLOQ e  $\pm 15\%$  do valor nominal de todos os outros pontos de CQ. A precisão, por outro lado, é medida com base no CV. Assim, a precisão intercorrida é obtida pelo cálculo do CV de cada um dos grupos de réplicas dos npiveis de concentração das amostras de CQ, devendo estes valores de CV serem  $\pm 20\%$  para o nível do LLOQ e  $\pm 15\%$  para os demais. O mesmo vale para a precisão intercorrida, a diferença é que isso é feito comparando os valores obtidos em 3 corridas realizadas em pelo menos dois dias diferentes (EMA, 2011; FDA, 2018; BRASIL, 2024).

A recuperação ou eficiência de extração é outro atributo do método que pode ser medido. Para tal, são comparados os resultados da análise de amostras branco fortificadas com o analito e submetidas ao processo de extração (preparo de amostra), com amostras branco que foram adicionadas do analito após o processo de extração, de forma a representar 100% de extração (ideal). O valor da recuperação deve ser consistente e reproduzível (FDA, 2018).

A integridade de diluição é um parâmetro testado para garantir que as diluições realizadas para aquele método não irão afetar a precisão e a exatidão das amostras. A diluição é necessária quando a concentração da amostra está acima do limite superior de quantificação. Nesses casos, a diluição pode ser feita com os mesmos solventes da fase móvel, ou caso sabido que isso poderá ocasionar uma alteração na proporção dos componentes da fase móvel, ela poderá ser realizada com matriz branco (EMA, 2011).

O teste à integridade da diluição funciona pelo uso de amostras de controle de qualidade que tenham concentrações muito acima do limite superior de quantificação e que passaram por diluição para que a concentração esteja inserida na faixa da curva analítica. Para estas amostras, são avaliadas a precisão e exatidão mantendo os mesmos critérios de aceitação vistos acima para concentrações nominais diferentes do limite inferior de quantificação ( $CV = \pm 15\%$  para precisão e exatidão igual a  $\pm 15\%$  do valor nominal). A EMA e o guia M10 do ICH recomendam que para cada fator de diluição testado, devem ser realizadas ao menos 5 réplicas por fator de diluição (EMA, 2011; ICH, 2022).

O sucesso de um método analítico também depende da estabilidade das amostras que serão analisadas em condições mimetizando um processo real de análise. Assim, durante a etapa de validação, é comum avaliar a estabilidade de amostras preparadas com matrizes frescas e a partir de soluções estoque recém-preparadas para avaliar a estabilidade de bancada (temperatura ambiente), estabilidade para ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade no amostrador automático (caso ele tenha condições de armazenamento distintas ou ainda não cobertas pelos outros estudos de estabilidade), estabilidade de solução estoque e estabilidade de longa duração nas condições em que estas amostras normalmente são armazenadas (p.ex: no caso da estabilidade de longa duração,  $-20^{\circ}\text{C}$ , que deve cobrir temperaturas menores também) (FDA, 2018). A EMA afirma que o critério de aceitabilidade para a estabilidade é que as amostras de controle de

qualidade preparadas para estudos de estabilidade sejam CQB (3 vezes o valor da concentração do limite inferior de quantificação) e CQA (perto do limite superior de quantificação). Essas amostras, como normalmente feito, são preparadas a partir de amostras branco adicionadas de analito e uma parte delas é imediatamente analisada enquanto que a outra parte será submetida ao estudo de estabilidade e analisada após períodos determinados. O resultado das amostras de estabilidade deve ser  $\pm 15\%$  em relação ao valor nominal de cada nível (EMA, 2011).

Quando a matriz analisada para a obtenção da concentração de um analito é o plasma, mesmo assim deve ser realizada a estabilidade nesse analito no sangue (matriz coletada), de modo que estes resultados devem fazer parte do relatório de validação (BRASIL, 2024).

A robustez de um método, embora não citada nos guias da EMA, FDA e da Anvisa, está relacionada à sua capacidade de fornecer resultados confiáveis mesmo diante de pequenas alterações em relação àquelas validadas. Ou seja, sua reprodutibilidade frente a uma série de pequenas mudanças operacionais, como diferentes analistas, laboratórios, instrumentos analíticos, temperaturas, reagentes etc. Entretanto, a legislação brasileira comenta sobre a robustez na RDC nº 166/2017, onde cita diversos fatores capazes de influenciar o método (mudanças de pH, mudanças de composição de fase móvel, fluxo de fase móvel, de fabricantes das colunas, tempo de extração, estabilidade das soluções analíticas, entre outros (BRASIL, 2017). Assim, a avaliação da robustez pode ser feita por meio da variação controlada dos fatores que afetam o desempenho do método, variando um fator de cada vez ou vários de uma vez (por meio de estratégias de Design Experimental) (GONZÁLEZ et al., 2014).

## **6 IMPORTÂNCIA DA QUÍMICA ANALÍTICA NA FORMAÇÃO DO PROFISSIONAL FARMACÊUTICO**

A química analítica é uma das ciências básicas ministrada dentro dos cursos de farmácia. O conhecimento sobre os princípios que regem as principais técnicas de preparo de amostra e também instrumentações analíticas possibilitam firmar o farmacêutico dentro do ramo das análises químicas, que são importantíssimas não somente dentro do desenvolvimento analítico da pesquisa acadêmica, mas também para o setor privado.

O programa brasileiro de genéricos, encabeçado por empresas como EMS, Eurofarma, Cimed, Prati-Donaduzzi, Aché, União Química, Biolab Genéricos, Medley entre outras, faz uso constante de técnicas de cromatografia associada ao sistema de detecção por espectrometria de massas, uma vez que a comprovação da biodisponibilidade relativa/bioequivalência em relação ao medicamento de referência é um requisito para aprovação do registro de genéricos e similares.

Nesse contexto, a hegemonia da LC-MS/MS é reforçada, por se tratar de um método que une uma técnica de separação muito robusta, seletiva, eficiente e capaz de realizar separações em tempo curto e passível de ampliação de escala com um sistema de detecção altamente sensível e seletivo, também passível de ampliação de escala devido à agilidade de análise e boa resposta para um grande número de moléculas em amostras complexas (PEREIRA et al., 2005).

Mesmo para moléculas tradicionalmente analisadas por GC-MS, como os esteróides, a LC-MS/MS tem ganhado espaço, principalmente por conta dos tempos de análise inferiores a 5 minutos e preparo de amostra mais simples, não requerendo derivatização. Pereira e colaboradores abordam em seu trabalho o exemplo da necessidade de derivatização de glicocorticóides em amostras de sangue de atletas para testes de dopagem esportiva num contexto em que a LC-UV apresenta baixa sensibilidade. A GC era usada então para contornar o problema da baixa sensibilidade, mas gerava a necessidade de derivatização devido à presença de uma ramificação hidroxietônica na estrutura desses analitos (posição 17), um ponto termodegradação. Com isso, o uso da GC-MS para analisar a estrutura original dos analitos ficava impossibilitada, sendo preciso transformar os analitos em derivados com estabilidade térmica suficiente para suportar o aumento de temperatura da cromatografia gasosa (PEREIRA et al., 2002).

A existência de um profissional que domine as questões relacionadas aos processos de produção de medicamentos e também capacitado para operar a instrumentação analítica envolvida na técnica de LC-MS/MS, desenvolver e avaliar criticamente um método analítico para matrizes complexas representa um nicho em constante crescimento, no qual o farmacêutico pode ser o diferencial, na medida em que o aperfeiçoamento das técnicas analíticas é sempre bem-vindo e necessário frente aos desafios oferecidos pela bioanálise de fármacos.

## 7 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizada uma revisão narrativa com o intuito de fornecer uma visão geral sobre os métodos bioanalíticos empregados na determinação de fármacos no sangue, focando principalmente em aspectos da LC-MS/MS. Apesar de existirem vários desafios analíticos relacionados ao uso desse tipo de método, como os problemas enfrentados para reduzir o efeito de matriz provocado pelos componentes do sangue, ainda assim, a combinação das características de rapidez, eficiência e versatilidade das colunas de LC com a alta sensibilidade e seletividade dos detectores por espectrometria de massas sequencial fazem com que esta metodologia seja visto por muitos como o padrão ouro das análises bioanalíticas.

A constante renovação de conhecimentos sobre esse tema é extremamente importante para a aprovação do registro de medicamentos novos, medicamentos similares e genéricos, bem como são imprescindíveis para melhorar a qualidade de vida de pacientes que necessitam de monitorização terapêutica, sendo fundamental de grande valia o papel do farmacêutico enquanto profissional capacitado para a realização destes tipos de análises devido aos conhecimentos de química analítica que são parte da grade curricular e sobretudo, da participação de laboratórios de pesquisa ativamente engajados dentro do campo bioanalítico.

## REFERÊNCIAS

- ADAWAY, J. E.; KEEVIL, B. G. Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2012.
- AGILENT. Sample Preparation Fundamentals for Chromatography. **Agilent Presentation**. [s.l: s.n.].
- AGRAWAL, A. et al. Green miniaturized technologies in analytical and bioanalytical chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2021.
- ALI, I. Gas chromatography: A tool for drug analysis in biological samples. **Chemistry International**, v. 6, n. 4, 2020.
- ALLOCHIO FILHO, J. F. et al. APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR PAPER SPRAY E TÉCNICAS RELACIONADAS NA ANÁLISE DIRETA DE MATRIZES BIOLÓGICAS PARA DETECÇÃO DE DROGAS - UMA REVISÃO. **Química Nova**, 2023.
- ANTIGNAC, J. P. et al. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. **Analytica Chimica Acta**. Anais...2005.
- ARGENTON, Ayrton. Conceitos fundamentais de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC). **Conselho Regional de Química-IV Região (SP)[in Portuguese]**, 2010.
- ARSLAN, Fatma Demet et al. Digoxin Levels and It's Stability in Different Blood Collection Tubes. JAREM. **Journal of Academic Research in Medicine**, v. 10, n. 2, p. 111, 2020.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. **Analytical Chemistry**, 1990.
- ASON, B.; ARMAH, F. A.; ESSUMANG, D. K. Characterization and quantification of endocrine disruptors in female menstrual blood samples. **Toxicology Reports**, 2022.
- BADAWY, M. E. I. et al. A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. **Analytical Sciences**, 2022.
- BALLOTARI, M. et al. Development of a new ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of digoxin and digitoxin in plasma: Comparison with a clinical immunoassay. **Electrophoresis**, v. 43, n. 9–10, 2022.
- BARCO, S. et al. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry platform for the routine therapeutic drug monitoring of 14 antibiotics: Application to critically ill pediatric patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 186, 2020.

BHADALIYA, C. et al. Development of a bioanalytical method for the quantification of sinococuline in human plasma and its application in phase I clinical pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 36, n. 4, 2022.

BICK, A. J. et al. Pharmacokinetics, metabolism and serum concentrations of progestins used in contraception. **Pharmacology and Therapeutics**, 2021.

BRASIL. Resolução - RDC nº 753, de 28 de setembro de 2022. Dispõe sobre o registro de medicamentos de uso humano com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, inovadores, genéricos e similares. Diário Oficial da União de 05/10/2022. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada.

BRASIL. Resolução - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União de 10/05/2012. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada.

BRASIL. Guia para validação de métodos bioanalíticos e análise de amostras de estudo para submissões regulatórias de medicamentos industrializados de uso humano. Versão 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **ANVISA**, 2024.

BRASIL. Manual de boas práticas em biodisponibilidade e bioequivalência. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência-Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos. Brasília: **ANVISA**, 2002.

BUSZEWSKI, B.; NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2012.

BUSZEWSKI, B.; SZULTKA, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 3, 2012.

BYLDA, C. et al. Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. **Analyst**, v. 139, n. 10, 2014.

C. MOLDOVEANU, S.; DAVID, V. Derivatization Methods in GC and GC/MS. Em: **Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application**. [s.l.: s.n.].

CHAMBERS, E. et al. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 852, n. 1–2, 2007.

CHANG, M. S. et al. Historical review of sample preparation for chromatographic bioanalysis: Pros and cons. **Drug Development Research**, 2007.

CHEN, D. et al. The QuEChERS method coupled with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of diuretics in animal-derived foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 101, 2021.

CHOUDHARY, Devendra et al. Prodrug design for improving the biopharmaceutical properties of therapeutic drugs. In: *The Future of Pharmaceutical Product Development and Research*. **Academic Press**, 2020. p. 179-226.

CHOW, S. C. Bioavailability and bioequivalence in drug development. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 6, n. 4, 2014.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: **Unicamp**, 2006.

CORTESE, M. et al. Compensate for or minimize matrix effects? strategies for overcoming matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry technique: A tutorial review. **Molecules**, 2020.

CRAIG, Charles R.; STITZEL, Robert E. (Ed.). *Modern pharmacology with clinical applications*. **Lippincott Williams & Wilkins**, 2004.

CROTTI, S.; SERAGLIA, R.; TRALDI, P. Some thoughts on electrospray ionization mechanisms. **European Journal of Mass Spectrometry**, 2011.

D'OVIDIO, C. et al. LC-MS/MS Application in Pharmacotoxicological Field: Current State and New Applications. **Molecules**, 2023.

DA SILVA, M. C. et al. Multiresidue Determination of Growth Promoters in Bovine Serum using QuEChERS and UHPLC-Q-ORBITRAP: Validation and In Vivo Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 42, 2023.

DASGUPTA, A. Immunoassays and Issues With Interference in Therapeutic Drug Monitoring. Em: **Clinical Challenges in Therapeutic Drug Monitoring: Special Populations, Physiological Conditions, and Pharmacogenomics**. [s.l: s.n.].

DAVID, V.; C. MOLDOVEANU, S. Recent Applications of Gas Chromatography in Bioanalysis. Em: **Novel Aspects of Gas Chromatography and Chemometrics**. [s.l: s.n.].

DESHPANDE, Mahesh M. et al. Practical approach for development and validation of bioanalytical method: A review. **Inventi Rapid: Pharm Analysis & Quality Assurance**, v. 2017, n. 1, p. 1-8, 2016.

DEVANSHU, S. et al. Quantitative Bioanalysis by LC-MS/MS: A Review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**. [s.l: s.n.].

DI TRANA, Annagiulia et al. QuEChERS Extraction and Simultaneous Quantification in GC-MS/MS of Hexahydrocannabinol Epimers and Their Metabolites in Whole Blood, Urine, and Oral Fluid. **Molecules**, v. 29, n. 14, 2024.

DUGHERI, S. et al. Advanced Solid-Phase Microextraction Techniques and Related Automation: A Review of Commercially Available Technologies. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, 2022.

DUKIĆ, L.; ŠIMUNDIĆ, A. M.; MALOGORSKI, D. Comparison of digoxin concentration in plastic serum tubes with clot activator and heparinized plasma tubes. **Biochemia Medica**, v. 24, n. 1, 2014.

ELATTAR, R. H.; KAMAL EL-DEEN, A. Porous material-based QuEChERS: Exploring new horizons in sample preparation. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2024.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Guideline on bioanalytical method validation**, 2011.

FANG, Z. et al. Overview of therapeutic drug monitoring and clinical practice. **Talanta**, 2024.

FARAJZADEH, M. A.; NOURI, N.; KHORRAM, P. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2014.

Farmacologia. Rang, H.P; Dale, M.M. **Editora Elsevier**, 8ª edição, 2016.

FDA. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. **Bioanalytical Method Validation**, n. May, 2018.

FELDMAN, P. L. Insights into the Chemical Discovery of Remifentanyl. **Anesthesiology**, 2020.

FIGUEIREDO, E. C.; BORGES, K.B.; QUEIROZ, M.E.C. Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos , **LTC-GEN**, Rio de Janeiro, 2015.

FONSECA, L. C. et al. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, 2006.

GARCIA, X. et al. Ion mobility–mass spectrometry for bioanalysis. **Separations**, 2021.

GOLAN, D. E. et al. Princípios de Farmacologia - A base fisiopatológica da farmacologia 4ª Ed. [s.l: s.n.].

GONZÁLEZ, O. et al. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. **Journal of Chromatography A**, 2014.

GONZÁLEZ, O.; ALONSO, R. M. Validation of bioanalytical chromatographic methods for the quantification of drugs in biological fluids. Em: **Handbook of Analytical Separations**. [s.l: s.n.]. v. 7.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; VARELA-MARTÍNEZ, D. A.; RIAÑO-HERRERA, D. A. Pesticide-Residue Analysis in Soils by the QuEChERS Method: A Review. **Molecules**, 2022.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. et al. Evolution and applications of the QuEChERS method. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2015.

GORITYALA, S.; ROOS, D.; DONG, M. W. Bioanalysis of small-molecule drugs and metabolites in physiological samples by LC-MS, part 1: An overview. **LC-GC North America**, v. 39, n. 6, 2021.

GOSETTI, F. et al. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2010.

GOYON, A. et al. Unraveling the mysteries of modern size exclusion chromatography - the way to achieve confident characterization of therapeutic proteins. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2018.

GRECO, V. et al. New Challenges in (Bio)Analytical Sample Treatment Procedures for Clinical Applications. **Separations**, 2023.

GUMUSTAS, M. et al. UPLC versus HPLC on drug analysis: Advantageous, applications and their validation parameters. **Chromatographia**, 2013.

GUPTA, A. et al. Application of a validated ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of darunavir in human plasma for a bioequivalence study in Indian subjects. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 24, 2011.

GUPTA, C. et al. Preparation of milk protein-vitamin A complexes and their evaluation for vitamin A binding ability. **Food Chemistry**, v. 237, 2017.

HALL, Terence G. et al. Identifying and overcoming matrix effects in drug discovery and development. **Tandem mass spectrometry—applications and principles**, v. 18, p. 390-419, 2012.

HAMMAD, S. F. et al. Homogeneous liquid–liquid extraction as an alternative sample preparation technique for biomedical analysis. **Journal of Separation Science**, 2022.

HASAN, MD. I. et al. Development of Generic Drug Products by Pharmaceutical Industries Considering Regulatory Aspects: A Review. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 09, n. 10, 2021.

HUMENIUK, R. et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Remdesivir, An Antiviral for Treatment of COVID-19, in Healthy Subjects. **Clinical and Translational Science**, v. 13, n. 5, 2020.

ICERI, Taciane Mitsuko. Avaliação sistemática do efeito de matriz em ensaios bioanalíticos por LC-MS/MS para a análise de rifampicina em fluidos biológicos / Taciane Mitsuko Iceri. **Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos**, 2011.

ICH. **Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis M10**. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, n. May, 2022.

JANKECH, T. et al. Derivatization of carboxylic groups prior to their LC analysis – A review. **Analytica Chimica Acta**, 2024.

JEMAL, M.; OUYANG, Z.; XIA, Y. Q. Systematic LC-MS/MS bioanalytical method development that incorporates plasma phospholipids risk avoidance, usage of incurred sample and well thought-out chromatography. *Biomedical Chromatography*, 2010.

JIANG, W. et al. Rapid Determination of 9 Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma in Human Plasma by QuEChERS-UPLC-MS/MS. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2022.

JONES, S. et al. An overview of sample preparation in forensic toxicology. **WIREs Forensic Science**, v. 4, n. 2, 2022.

JOSEFSSON, M.; SABANOVIC, A. Sample preparation on polymeric solid phase extraction sorbents for liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of human whole blood-A study on a number of beta-agonists and beta-antagonists. **Journal of Chromatography A**, v. 1120, n. 1–2, 2006.

JUHASCIK, M. P.; JENKINS, A. J. Comparison of liquid/liquid and solid-phase extraction for alkaline drugs. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 7, 2009.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa; CARNEIRO, José. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Acesso em: 23 maio 2024.

KANG, Ju-Seop. Principles and applications of LC-MS/MS for the quantitative bioanalysis of analytes in various biological samples. **Tandem Mass Spectrometry–Applications and Principles**, v. 29, p. 441-92, 2012.

KHATIBI, S. A.; HAMIDI, S.; SIAHI-SHADBAD, M. R. Current trends in sample preparation by solid-phase extraction techniques for the determination of antibiotic residues in foodstuffs: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2021.

KING, R. et al. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 11, n. 11, 2000.

KUMAR, D.; GAUTAM, N.; ALNOUTI, Y. Analyte recovery in LC-MS/MS bioanalysis: An old issue revisited. **Analytica Chimica Acta**, v. 1198, 2022.

LI, M. et al. Simultaneous LC-MS/MS bioanalysis of alkaloids, terpenoids, and flavonoids in rat plasma through salting-out-assisted liquid-liquid extraction after oral administration of extract from *Tetradium ruticarpum* and *Glycyrrhiza uralensis*: a sample preparation strategy to broaden analyte coverage of herbal medicines. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 413, n. 23, 2021.

LI, P. et al. Quantitation of cotinine and its metabolites in rat plasma and brain tissue by hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry

(HILIC-MS/MS). **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 907, 2012.

LIANG, J.; FIEG, G.; JAKOBTORWEIHEN, S. Molecular dynamics simulations of competitive protein adsorption onto chromatographic media. Em: **Computer Aided Chemical Engineering**. [s.l: s.n.]. v. 33.

LIMA, V. V. DE; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Desenvolvimento de colunas cromatográficas de meios de acesso restrito proteína-imobilizada e suas avaliações para análise de fármacos com injeção direta de plasma humano. **Química Nova**, v. 29, n. 1, 2006.

MAJHI, P. K. et al. Low-volume plasma sampling for determination of dextromethorphan and dextrorphan in rat plasma: LC-MS/MS method and its application in pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 37, n. 4, 2023.

MAKURVET, F. D. Biologics vs. small molecules: Drug costs and patient access. **Medicine in Drug Discovery**, v. 9, 2021.

MANGLA, B. et al. Development and validation of a high throughput bioanalytical UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of tamoxifen and sulphoraphane in rat plasma: Application to an oral pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1152, 2020.

MARINA, M. L.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Fundamentals of capillary electrophoresis. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 45, 2005.

MARTÍNEZ-CHÁVEZ, A. et al. Bioanalytical method for the simultaneous quantification of irinotecan and its active metabolite SN-38 in mouse plasma and tissue homogenates using HPLC-fluorescence. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1149, 2020.

MARTINS, M. L. et al. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): Fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, 2012.

MASSON, P.; SHAIHUTDINOVA, Z.; LOCKRIDGE, O. Drug and pro-drug substrates and pseudo-substrates of human butyrylcholinesterase. **Biochemical Pharmacology**, 2023.

MEIRINHO, S. et al. Novel bioanalytical method for the quantification of rufinamide in mouse plasma and tissues using HPLC-UV: A tool to support pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1124, 2019.

MIURA, M.; TAKAHASHI, N. Routine therapeutic drug monitoring of tyrosine kinase inhibitors by HPLC-UV or LC-MS/MS methods. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, 2016.

MOEIN, M. M.; EL BEQQALI, A.; ABDEL-REHIM, M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. **Journal of**

**Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1043, 2017.

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Separation and preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction procedure: Recent applications. **Chromatographia**, 2011.

OTHMAN, Weam M. et al. Development of an eco-friendly capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of piperacillin, tazobactam and ibuprofen in plasma samples: application to a pharmacokinetic study in rats. **RSC advances**, v. 14, n. 32, p. 23378-23391, 2024.

PAI MANGALORE, R. et al. The clinical application of beta-lactam antibiotic therapeutic drug monitoring in the critical care setting. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2023.

PECK PALMER, O. M.; DASGUPTA, A. Review of the Preanalytical Errors That Impact Therapeutic Drug Monitoring. **Therapeutic Drug Monitoring**, 2021.

PEREIRA, A. DOS S. et al. Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, 2005.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, 2007.

PEREIRA, H. M. G. et al. Análise de glicocorticosteróides por CG-EM: uma nova abordagem de derivatização para o controle de dopagem no esporte. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, 2002.

PERESTRELO, R. et al. QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Analytica Chimica Acta**, 2019.

PRATIWI, R. et al. Recent Advances in the Determination of Veterinary Drug Residues in Food. **Foods**, 2023.

Protein Data Bank. Crystal Structure of Human Serum Albumin. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/1AO6>. Acesso em: 15 de julho de 2024.

PUSZKIEL, A. et al. A simple HPLC-UV method for quantification of enzalutamide and its active metabolite N-desmethyl enzalutamide in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1058, 2017.

RAFFAELLI, A.; SABA, A. Ion scanning or ion trapping: Why not both? **Mass Spectrometry Reviews**, 2023.

RAPOSO, F.; IBELLI-BIANCO, C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2020.

REZAEI, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, 2006.

ROBERTS, J. A.; TACCONE, F. S.; LIPMAN, J. Understanding PK/PD. **Intensive Care Medicine**, v. 42, n. 11, 2016

RODRIGUES, T. B. et al. Development and Validation of a Method for Quantification of 28 Psychotropic Drugs in Postmortem Blood Samples by Modified Micro-QuEChERS and LC-MS-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 45, n. 7, 2021.

ROSENBAUM, S. Basic pharmacokinetics and pharmacodynamics: an integrated textbook and computer simulations. [S.l.]: **John Wiley and Sons**, 2011.

ROTHER, E. T. Revisão sistemática X revisão narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 20, n. 2, 2007.

ROZET, E. et al. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2011.

RUHAAK, L. R.; LEBRILLA, C. B. Applications of Multiple Reaction Monitoring to Clinical Glycomics. **Chromatographia**, 2015.

RUZYCKI, C. A. et al. Combined in Vitro-in Silico Approach to Predict Deposition and Pharmacokinetics of Budesonide Dry Powder Inhalers. **Pharmaceutical Research**, v. 37, n. 10, 2020.

SANGSTER, T. et al. Unexpected observation of ion suppression in a liquid chromatography/ atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric bioanalytical method. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 12, 2004.

SANTANA-MAYOR, Á. et al. Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2019.

SCHRAG, M.; REGAL, K. Pharmacokinetics and Toxicokinetics. Em: **A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development**. [s.l.: s.n.].

SICHILONGO, K. et al. Comparison of efficiencies of selected sample extraction techniques for the analysis of selected antiretroviral drugs in human plasma using LC-MS. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 89, 2018.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by LC-ESI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 4, 2004.

STOKVIS, E.; ROSING, H.; BEIJNEN, J. H. Liquid chromatography-mass spectrometry for the quantitative bioanalysis of anticancer drugs. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 6, 2005.

SVERDLOFF, C. et al. Estudo de bioequivalência entre duas formulações contendo oxalato de escitalopram. **Revista Neurociências**, v. 31, 2023.

SWART, Daniël H. et al. Safety, tolerability and toxicokinetics of the novel mitochondrial drug SUL-138 administered orally to rat and minipig. **Toxicology Reports**, v. 12, p. 345-355, 2024.

ŚWIĄDRO, M. et al. Development of a new method for drug detection based on a combination of the dried blood spot method and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1157, 2020.

TAKTODE, Amol D. et al. **Bioanalytical Method Development and Validation for Estimation of Active Pharmaceutical Substance by LC-MS/MS: A General Review on Bioanalysis**. 2024.

TAY, K. S. J.; SEE, H. H. Recent Advances in Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for Pharmaceutical Analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 2023.

THAKUR, A. et al. Bioanalytical strategies in drug discovery and development. **Drug Metabolism Reviews**, 2021.

TREDER, N. et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method with a fluorescence detector for the analysis of epirubicin in human urine and plasma, and its application in drug monitoring. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1136, 2020.

TUZIMSKI, T.; PETRUCZYNIK, A. Review of Chromatographic Methods Coupled with Modern Detection Techniques Applied in the Therapeutic Drugs Monitoring (TDM). **Molecules**, 2020.

VAN EECKHAUT, A. et al. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2009.

VAN NULAND, M. et al. Bioanalytical LC-MS/MS validation of therapeutic drug monitoring assays in oncology. **Biomedical Chromatography**, 2020.

VARELA-MARTINEZ, Diana A. et al. Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) extraction. In: Liquid-phase extraction. **Elsevier**, 2020. p. 399-437.

VISCONTI, G. et al. From fundamentals in calibration to modern methodologies: A tutorial for small molecules quantification in liquid chromatography-mass spectrometry bioanalysis. **Analytica Chimica Acta**, 2023.

VOSOUGH, M.; TEHRANI, S. M. Development of a fast HPLC-DAD method for simultaneous quantitation of three immunosuppressant drugs in whole blood samples using intelligent chemometrics resolving of coeluting peaks in the presence of blood interferences. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1073, 2018.

WADHAWAN, M.; GUPTA, C. Immunosuppression Monitoring—What Clinician Needs to Know? **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, 2023.

WAN, Q. et al. A critical review of molecularly imprinted solid phase extraction technology. **Journal of Polymer Research**, 2021.

WANG, Feng et al. Quantification of multiple steroid hormones in serum and human breast cancer tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. **Frontiers in Oncology**, v. 14, 2024.

WHO. World Health Organization Use of Anticoagulants in Diagnostic. **Who**, 2002.

Wikipedia. Vitamin C. Disponível em: [https://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin\\_C](https://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C). Acesso em: 10 de agosto de 2024.

XING, Y. et al. Therapeutic Monitoring of Plasma Digoxin for COVID-19 Patients Using a Simple UPLC-MS/MS Method. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 17, n. 10, 2020.

YADAV, J. et al. Recent developments in in vitro and in vivo models for improved translation of preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics data. **Drug Metabolism Reviews**, 2021.

YANG, Z. MEI et al. A simple and sensitive LC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of digoxin in children. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1221, 2023.

ZAMBONIN, C.; ARESTA, A. Recent applications of solid phase microextraction coupled to liquid chromatography. **Separations**, 2021.

ZHANG, Y.; ZHANG, R. Recent advances in analytical methods for the therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs. **Drug Testing and Analysis**, 2018.

ZHENG, M. et al. Simultaneous Determination of Six Immunosuppressants in Human Whole Blood by HPLC-MS/MS Using a Modified QuEChERS Method. **Molecules**, v. 27, n. 13, 2022.