

NILO JOSÉ COELHO DUARTE

**Método UHPLC-MS/MS para determinação da
hidroxicloroquina e seus principais metabólitos em fluído oral
e sangue total para monitorização terapêutica de drogas**

São Paulo

2023

NILO JOSÉ COELHO DUARTE

**Método UHPLC-MS/MS para determinação da
hidroxicloroquina e seus principais metabólitos em fluído oral
e sangue total para monitorização terapêutica de drogas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências
Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético
Orientador: Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva

(Versão corrigida. Resolução CoPGr nº 6018, de 13 de outubro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.)

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Duarte, Nilo Jose Coelho

Método UHPLC-MS/MS para determinação da hidroxiclороquina e seus principais metabólitos em fluido oral e sangue total para monitorização terapêutica de drogas / Nilo Jose Coelho Duarte. -- São Paulo, 2023.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Orientador: Clovis Artur Almeida da Silva.

Descritores: 1.Hidroxiclороquina
2.Espectrometria de massas 3.Monitorização terapêutica de drogas 4.Validação de método 5.Lúpus eritematoso sistêmico

USP/FM/DBD-187/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Cecília que é minha companheira de todos os momentos, inclusive de doutorado, sempre cuidando de mim e de nossa família com muito amor e carinho. Às minhas filhas Catarina e Nicole que são tudo na minha vida e já me ensinaram muito.

Ao meu pai Prof. Alberto Duarte, que me guiou em toda minha formação profissional e pessoal através de exemplo. Obrigada por ter aberto caminhos e me orientado como filho e médico.

À minha mãe Alice Coêlho, que está sempre perto e pronta para ajudar e fazer alguma comida gostosa e participar dos meus experimentos culinários a qualquer momento.

Aos meus irmãos, Antônio, Alberto e Ricardo, que apesar das personalidades tão diferentes, agregaram sempre com seu apoio e dividiram comigo minha história e memórias de infância.

Ao meu orientador Prof. Clóvis, que no seu incrível alto astral faz com que qualquer problema fique fácil de superar. À minha coorientadora Profa. Eloisa que é uma grande líder sempre guiando todos para as melhores soluções.

Ao grupo da Reumatologia, da equipe da pós-graduação, do ambulatório de Reumatologia, médicos assistentes e médicos residentes, por me auxiliarem a fazer esse trabalho se concretizar.

Aos amigos da Toxicologia Paschoalina, Persio, Marc, Nina e Ricardo Alexandre que estão sempre trabalhando de forma exemplar e deixando minha vida como chefe do setor muito mais tranquila. Em especial a Paschoalina, que está até hoje me ensinando tudo sobre validação de métodos.

Ao Dr. Vitor e aos alunos da iniciação científica, Carolina Ribeiro e a Gioanna Zou, pelo trabalho na busca e coleta dos pacientes no ambulatório.

Um agradecimento especial ao Leonard, que conduziu todo o projeto temático de forma exemplar e foi fundamental na condução do meu projeto de doutorado.

Ao Dr. Valdemir Melechco Carvalho por trazer a ideia de trabalhar com matrizes alternativas e todo o apoio que nos deu durante o projeto.

Àqueles que estruturaram minha base profissional, Prof. Adagmar Andriolo por ter aberto as portas da Patologia Clínica para mim e por ser um exemplo de professor, Profa. Leila Antonangelo que vem sendo minha chefe desde os tempos de preceptoria, sempre me ensinando muito em todos esses anos e Profa. Silvia Santos que nos adotou e abriu a porta da Farmacocinética e Farmacodinâmica para o nosso grupo.

Aos meus amigos que trabalham comigo desde o início da minha carreira, Nairo e Bete que sempre me ajudaram muito na minha formação profissional, aos colegas da Bioquímica por todos esses anos de parceria e amizade, a todos os amigos da DLC pelo apoio durante o tempo que estamos juntos e à equipe da CRIM, passada e atual, pela ajuda e amizade nesses anos.

Nossa base se forma com a construção feita pelos nossos antepassados, portanto entendo ser de fundamental importância agradecer àqueles que não estão, mas se fazem presentes através do seu legado, meus avós Nilo e Maria Tereza Coêlho e Paulo e Nise Duarte, pelo amor e ensinamentos que transcendem as gerações.

E aos pacientes, que gentilmente cederam seu tempo e foram essenciais para nosso projeto.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo. Divisão de Biblioteca e Documentação: 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. MÉTODOS.....	6
3.1. Produtos Químicos e Reagentes.....	7
3.2. Preparo dos Reagentes, Curva de Calibração e Controle.....	7
3.3. Preparo da Amostra.....	8
3.4. Equipamento LC-MS/MS e Aquisição de Parâmetros.....	8
3.5. Validação do Método.....	9
4. RESULTADOS.....	14
4.1. Desenvolvimento do Método.....	15
4.2. Validação do Método.....	18
5. DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÃO.....	27
8. REFERÊNCIAS	29
9. APÊNDICES.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAO= Academia Americana de Oftalmologia

AMR= faixa de medição analítica

- BDCQ= Bidesetilcloroquina
- CLSI= Clinical Laboratories Standards Institute
- CV= coeficiente de variação
- CYP= Citocromo
- DCQ= Desetilcloroquina
- DHCQ= Desetilhidroxicloquina
- FDA= Food and Drug Administration Regulations
- HCQ= Hidroxicloroquina
- LC-MS/MS= Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial
- LES= Lupus eritematoso sistêmico
- LLOQ= análise do limite de quantificação
- LQ= limite de quantificação
- MS= Espectrometria de massas
- SEM= método de monitoramento de reação selecionada
- SPE= Extração em fase sólida
- SRW= Ultra-pura
- UHPLC-MS/MS= Cromatografia líquida de ultra-performance acoplada a espectrometria de massa sequencial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito do pH na fase aquosa por UHPLC-MS/MS SPE (extração em fase sólida) em linha, BDCQ-

Bidesetilcloroquina, DHCQ- desetilhidroxicloroquina, DCQ-Desetilcloroquina, HCQ-Hidroxicloroquina.....	17
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limite inferior de quantificação para hidroxiclороquina e metabólitos no sangue e fluido oral.....	18
Tabela 2 - Precisão intra e inter-ensaio em concentrações baixas, médias e altas de hidroxiclороquina e metabólitos no sangue total e fluido oral.....	19
Tabela 3 - Recuperação de hidroxiclороquina e metabólitos no sangue total e fluido oral.....	19
Tabela 4- Efeito matriz para hidroxiclороquina e metabólitos no sangue total e fluido oral.....	20
Tabela 5- Avaliação de interferências para medição de hidroxiclороquina e metabólitos em sangue total.....	21

RESUMO

Duarte NJC. Método UHPLC-MS/MS para determinação da hidroxiclороquina e seus principais metabólitos em fluido oral e sangue total para monitorização terapêutica de drogas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: Concentrações sanguíneas de hidroxiclороquina (HCQ) são usadas para monitorizar a eficácia, segurança e aderência do paciente ao tratamento. O fluido oral surgiu como uma matriz alternativa não invasiva, de fácil acesso e de baixa complexidade para monitoramento de drogas terapêuticas. Entretanto, não existe um método analítico descrito para dosagem de HCQ no fluido oral. Portanto, desenvolvemos e validamos um método de cromatografia líquida de ultra desempenho acoplado a espectrometria de massa sequencial (UHPLC-MS/MS) para a análise das concentrações de HCQ e seus principais metabólitos em fluido oral e comparamos ao sangue total. **Métodos:** Para o preparo da amostra foram utilizados 10 microlitros das matrizes para precipitação de proteínas seguida de extração em fase sólida em linha. O processo de validação incluiu as avaliações do limite de quantificação, linearidade, precisão, recuperação, efeito matriz, arraste de amostra e critérios para diluição da amostra. **Resultados:** O limite de quantificação foi 50 ng/mL para HCQ e seus metabólitos no fluido oral e sangue total. A curva de calibração se mostrou linear entre 50 até 2000 ng/mL ($r^2 = 0.999$). O coeficiente de variação para a precisão do ensaio foi de 1,2 a 9,7% para intra-ensaio e 1,1 a 14,2% para interensaio para ambos HCQ e seus metabólitos no fluido oral e sangue total em 150, 750 e 1250 ng/mL. A recuperação ficou entre 85,3 a 118,5 % para 150, 750 e 1250 ng/mL de HCQ e seus metabólitos no fluido oral e sangue total. Fator de diluição até 5 vezes foi validado para concentrações acima do limite superior de quantificação. **Conclusões:** O método validado se mostrou específico, preciso e com acurácia para determinar o intervalo analítico para monitorização terapêutica da HCQ e seus metabólitos no fluido oral e sangue total. **Declaração de impacto:** O artigo é sobre um novo método de LC-MS/MS para determinação da hidroxiclороquina e seus metabólitos no fluido oral e sangue total para monitorização terapêutica de drogas. O método foi desenvolvido e validado com sucesso. O método reportado é o primeiro a medir a hidroxiclороquina e seus metabólitos em fluido oral. A quantidade de amostra necessária é a menor já reportada na literatura para fluido oral e sangue. O método seria benéfico no ambiente clínico onde a amostragem de sangue enfrenta limitações, particularmente nas populações pediátricas e idosa, e naqueles com fluido oral reduzido como os pacientes com síndrome Sjögren.

Descritores: Hidroxiclороquina. Espectrometria de massas. Monitorização terapêutica de drogas. Validação de método. Lúpus eritematoso sistêmico.

ABSTRACT

Duarte NJC. *UHPLC-MS/MS method for determination of hydroxychloroquine and its main metabolites in oral fluid and whole blood for therapeutic drug monitoring* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Background: Hydroxychloroquine (HCQ) blood levels are used to monitor efficacy, safety, and patient adherence during treatment. Oral fluid has emerged as an alternative non-invasive, easily accessible, and low-complexity matrix for drug monitoring. However, there is no analytical method to measure HCQ in oral fluid. Therefore, we developed and validated an ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass (UHPLC-MS/MS) method for the measurement of HCQ and its main metabolites in oral fluid and compared to whole blood. **Methods:** Ten microliters of matrices were used for sample preparation by protein precipitation with acetonitrile followed by online solid phase extraction. The validation process included assessment of lower limit of quantification, linearity, precision, recovery, matrix effect, interferences assessment, carry over, and sample dilution validation. **Results:** The lower limit of quantification was 50 ng/mL for HCQ and metabolites in both oral fluid and whole blood. The calibration curve was linear from 50 to 2000 ng/mL ($r^2 = 0.999$). The coefficient of variation for precision assay was 1.2 to 9.7% for intra-day and 1.1 to 14.2% for inter-day for both HCQ and metabolites in oral fluid and whole blood samples at 150, 750, and 1250 ng/mL. The recovery was 85.3 to 118.5 % for 150, 750, and 1250 ng/mL of HCQ and metabolites in both oral fluid and whole blood. Dilution factor up to 5-folds was validated for concentrations higher than the upper limit of quantification. **Conclusions:** The validated method is specific, precise, and accurate to determine analytical range for therapeutic monitoring of HCQ and its main metabolites in oral fluid and blood. **Impact Statement:** The article is about a new LC-MS/MS method for the measurement of hydroxychloroquine and its main metabolites in oral fluid and blood for therapeutic drug monitoring. The method was successfully developed and validated. The reported method is the first to measure hydroxychloroquine and metabolites in oral fluid. The amount of sample required is the lowest reported in the literature for both oral fluid and blood. The method would be beneficial in the clinical setting where blood sampling faces limitations, particularly in the pediatric and elderly population, and in those with reduced oral fluid such as Sjögren syndrome patients.

Descriptors: Hydroxychloroquine. Mass spectrometry. Therapeutic drug monitoring. Method validation. Systemic lupus erythematosus.

1. INTRODUÇÃO

A hidroxicloroquina (HCQ) é uma aminoquinolona que foi inicialmente desenvolvida como uma droga antimalárica, e depois foi recomendada para tratar uma variedade de doenças crônicas como as doenças reumáticas autoimunes: artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico (LES), lúpus discoide, síndrome de Sjögren's e sarcoidose¹. Para pacientes com LES em particular, a HCQ permanece como um pilar do cuidado² e deve ser continuada indefinitivamente nos pacientes pelos efeitos imunomodulatórios e múltiplos outros benefícios terapêuticos, tais como redução da concentração de lipídeos, regulação da glicose e efeitos antitrombóticos³⁻⁵. A hidroxicloroquina é metabolizada pelas enzimas CYP, que catalisam o processo de alquilação para gerar os principais metabolitos desetilhidroxicloroquina (DHCQ), desetilcloroquina (DCQ) e bidesetilcloroquina (BDCQ)¹.

Como uma doença crônica, o LES apresenta desafios no diagnóstico e tratamento, e um dos principais desafios é a aderência dos pacientes. Nesse contexto, a determinação das concentrações sanguíneas da HCQ é recomendada para avaliar a efetividade terapêutica⁶. Em pacientes adultos com LES, concentrações sanguíneas menores que 1000 ng/mL foram associadas com atividade da doença, também como um forte preditor de exacerbação da doença nos seis meses subsequentes⁷. O ajuste de dose é necessário para esses pacientes já que uma grande variabilidade na concentração da HCQ entre pacientes foi reportada⁷⁻⁹. Além disso, pesquisas anteriores sugeriram uma relação entre as concentrações dos metabólitos da HCQ e a eficácia e toxicidade em pacientes com artrite reumatoide¹⁰, reforçando a necessidade de validar um método quantitativo que permita uma determinação com acurácia da HCQ e seus principais metabolitos.

Concentrações sanguíneas da HCQ também podem ser usadas para evitar a superdosagem causada pela exposição de longo termo ou pela variabilidade intra e inter paciente¹¹. Um dos mais importantes efeitos tóxicos da HCQ é a retinopatia, que pode levar a perda permanente da visão¹. Em 2016, a Academia Americana de Oftalmologia (AAO) recomendou uma dose máxima de segurança de 5 mg/kg/dia para minimizar a retinopatia associada a HCQ^{2,12}. Entretanto, o alvo deve ser os níveis em sangue total ao invés da dose já que a mesma dose pode produzir níveis distintos em diferentes pacientes.

O fluido oral surgiu como uma matriz alternativa para individualizar e otimizar a terapia em doenças crônicas por ser uma matriz não invasiva de baixa complexidade, e mostrou uma boa correlação com a concentração da droga livre no soro^{13,14}. Apesar de existir uma literatura consistente sobre a monitorização de drogas no fluido oral, existem poucos relatos para drogas antirreumáticas e imunossupressoras^{15,16}. O desenvolvimento recente de espectrômetros de massa de alto desempenho permitiu a análise de concentrações de drogas muito baixas num pequeno volume de matrizes não convencionais¹⁷⁻¹⁹. No campo da reumatologia, existem poucos estudos sobre a monitorização de níveis de drogas circulantes^{6,20-22}, mas não há nenhum relato em monitorização de HCQ e seus metabolitos em fluido oral.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi de desenvolver e validar um método bidimensional de cromatografia líquida de ultra desempenho acoplada a espectrometria de massas para análise quantitativa de HCQ e seus principais metabolitos DCQ, BDCQ e DHCQ em fluido oral e sangue total para monitorização terapêutica em LES.

2. OBJETIVOS

Desenvolver e validar um método bidimensional de cromatografia líquida de ultra desempenho acoplada a espectrometria de massas para análise quantitativa de HCQ e seus principais metabolitos DCQ, BDCQ e DHCQ em fluido oral e sangue total para fins de monitorização terapêutica em pacientes com LES.

3. MÉTODOS

3.1. Produtos Químicos e Reagentes

Padrões para HCQ, DCQ, BDCQ e DHCQ, e seus padrões internos marcados com isótopos pesados correspondentes: HCQ- d_4 , DCQ- d_4 , BDCQ- d_4 e DHCQ- d_4 foram obtidos da *Toronto Research Chemicals* (North York, Canada). Acetato de amônia, formiato de amônia, metanol, acetonitrila e ácido fórmico grau LC/MS foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Água ultra-pura SRW foi produzida por Milli-Q® Gradient Merck (Darmstadt, Germany). As amostras humanas livres de droga usadas neste estudo foram obtidas de voluntários saudáveis que assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética Local no nosso Hospital Universitário (#940.610).

3.2. Preparo dos Reagentes, Curva de Calibração e Controle

As amostras de sangue livre de droga foram coletadas em tubos de heparina (BD Vacuette®, Greiner Bio-One GmbH, Austria) e as amostras de fluido oral foram coletadas usando *swabs* de polyester Salivette® (Sarstedt, Numbecht, Germany).

Foram preparadas soluções de estoque de 1 mg/mL e soluções de trabalho de 100, 20 e 2 µg/mL para os padrões de HCQ e seus metabolitos. Para os padrões internos foram preparadas soluções de estoque de 1 mg/mL e soluções de trabalho de 100 e 0,5 µg/mL. Todas as soluções foram preparadas em metanol e estocadas a -20°C. A curva de calibração foi preparada adicionando uma série de soluções de trabalho diluídas em amostras de sangue total e fluido oral livres de droga para atingir os padrões de calibração a 50, 100, 200, 500,

1000, 1500 e 2000 ng/mL. Amostras de controle de qualidade de concentrações de 75, 750 e 1600 ng/mL também foram preparadas. As curvas de calibração e controles de qualidade foram ambos estocados a -20°C e foram usados para preparar uma nova curva de calibração e controles de qualidade para cada análise.

3.3. Preparo da Amostra

Para o preparo dos padrões de calibração e controles de qualidade 10 µL de padrão interno (500 ng/mL em metanol) foram adicionados a 10 µL de sangue total ou fluido oral e 80 µL de acetonitrila. A mistura foi agitada por 20 segundos e centrifugada por 8 minutos a 13.500 rpm (1600 g). Então, 30 µL do sobrenadante foi combinado com 90 µL de água ultrapura num adaptador interno de vidro.

3.4. Equipamento LC-MS/MS e Aquisição de Parâmetros

A análise bidimensional cromatográfica foi realizada num cromatógrafo líquido de ultra performance Dionex UltiMate 3000 equipado com uma bomba DGP-3600, amostrador WPS-3000TRS e forno de coluna com 2 posições TCC-3000RS e válvula de 6 posições TitanHT (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Foram injetados 40 µL da amostra preparada numa coluna de extração em linha, SolEx™ RSLC HPD, 2,1 x 20 mm mantida a 40°C. Essa coluna foi eluída com um gradiente binário composto por uma fase aquosa (água) e fase orgânica composta por metanol, acetonitrila, água ultrapura e ácido fórmico (50:40:9,5:0,5, v/v) com fluxo de 1 mL/min. O gradiente iniciou com 100% de fase aquosa, que foi mantido até 5,0 min. A proporção de fase aquosa foi gradualmente reduzida até

15% entre 5,2 min e 9,8 min, e no final retornou as condições iniciais (100%). Os analitos foram transferidos por fluxo direto para uma coluna analítica de fase reversa pentafluorofenil (Accucore PFP 80 A, 50 × 2,1 mm, 2,6 µm) e separação cromatográfica ocorreu através de um gradiente binário de fase aquosa (acetato de amônia 25 mM, pH=4,5) e fase orgânica composta por metanol:acetonitrila (v/v) (70:30), num fluxo de 0,4 mL/min. A eluição começou com 32% de fase orgânica, que foi aumentada gradualmente até 86% entre 2,0 e 7,0 min. Então, 86% da fase orgânica foi mantida até 8,0 minutos, posteriormente reduzida gradualmente à condição inicial (32%). A detecção foi realizada em um espectrômetro de massas TSQ Altis™ Triplo Quadrupolo (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) em modo de ionização positiva por eletropulverização em modo de monitoramento de múltipla reação. Os dados foram processados e quantificados usando o *software* Trace Finder (Thermo Fisher Scientific). O controle de qualidade e a adequação do sistema foram realizados usando o *software* Skyline.

3.5. Validação do Método

A validação do método foi realizada de acordo com as diretrizes para validação de métodos bioanalíticos das diretrizes do “United States Food and Drug Administration Regulations” (FDA) e “Clinical Laboratories Standards Institute (CLSI)”²³⁻²⁶.

A validação para o fluido oral e sangue total incluiu a análise do limite de quantificação (LLOQ), linearidade, faixa de medição analítica (AMR), precisão intra-ensaio, precisão inter-ensaio, efeito matriz, recuperação, análise de interferentes, carregamento e validação da diluição da amostra, descritos abaixo.

3.5.1. Limite de Quantificação

Para estabelecer o limite de quantificação (LQ), cinco diluições (1/2, 1/10, 1/20, 1/40) de HCQ e seus metabolitos foram preparados de uma matriz adicionada a uma solução a 2000 ng/mL. O LQ foi assumido como a concentração mais baixa com um coeficiente de variação (CV) de 15% ou menos e um viés entre a concentração experimental *versus* esperada de 20% ou menos.

3.5.2. Linearidade

Para a verificação da linearidade, amostras entre 50 e 2000 ng/mL foram preparadas em matrizes livres de droga. O intervalo do estudo compreende a faixa analítica de medição e a concentração sanguínea clinicamente relevante esperada para pacientes com LES tratados com HCQ na dose recomendada^{7,9,12}. Uma simples checagem da acurácia da curva de calibração foi realizada analisando todos os níveis de calibração em cinco replicatas. A curva de calibração foi considerada linear se o $r^2 \geq 0.98$, com um erro sistemático para cada nível $\leq 15\%$ entre as concentrações teóricas e medidas, e um CV de 15% ou menos considerando as 5 replicatas.

3.5.3. Precisão Intra-ensaio

Vinte alíquotas de amostras com concentrações baixa, média e alta foram analisadas em dois períodos distintos do mesmo dia e o CV foi calculado. A repetibilidade, isso é, a concordância entre os resultados num curto período de tempo com o mesmo analista e o mesmo equipamento, foram considerados aceitáveis se o CV foi menor de 15%. A acurácia foi calculada como o percentual de desvio entre as concentrações teórica e medida e foi considerada aceitável se 20% ou menos.

3.5.4. Precisão Inter-ensaio

Vinte alíquotas de ambas as matrizes foram analisadas em concentrações baixa, média e alta em dois períodos distintos, manhã e tarde, durante 5 dias. Essas amostras foram guardadas em microtubos de polipropileno e refrigeradas (2-8°C). A reprodutibilidade dos resultados foi considerada adequada dentro do CV de 15%. A acurácia foi calculada como a porcentagem de desvio entre a concentração teórica e a medida. Ela foi considerada adequada se 20% ou menos.

3.5.5. Acurácia

A acurácia foi estimada pela dosagem da recuperação adicionando padrões de concentração conhecida a cinco amostras previamente analisadas de concentração conhecida, processadas em triplicata. A diferença entre os resultados esperados e os obtidos experimentalmente foram expressos em porcentagem e considerados aceitáveis se numa faixa de 80 a 120%.

3.5.6. Efeito Matriz

O efeito de matriz foi avaliado de acordo com o método de *Matuszewski* (2003)²⁷. Amostras foram preparadas em três níveis (75, 750, 1600 ng/mL) em três grupos (grupo 1, grupo 2, grupo 3). As amostras do grupo 1 foram preparadas em fase móvel. O grupo 2 foi preparado em extratos de fluido oral e sangue obtidos de 5 doadores diferentes e adicionados após a extração. O grupo 3 foi preparado da forma do grupo 2, mas a adição foi realizada antes da extração. O efeito matriz foi obtido comparando a razão de área entre os picos dos analitos e seus respectivos padrões internos obtidos nos 3 grupos. Resultados foram expressos como a média e com o desvio padrão obtidos para

as matrizes dos cinco doadores. O efeito matriz foi considerado insignificante quando a concentração dosada ficou entre 80 e 120% da concentração teórica.

3.5.7. Avaliação de Interferentes

Interferentes endógenos como bilirrubina, hemoglobina e triglicérides foram analisados no sangue em três níveis diferentes. Para potenciais interferentes exógenos, amostras positivas para algumas drogas que são prescritas frequentemente em terapias combinadas com HCQ foram analisadas em suas faixas terapêuticas (Prednisolona 100 ng/mL, Tacrolimus 6,3 µg/mL e Ácido micofenólico 2,4 µg/mL). As amostras de sangue positivas para essas drogas como “branco” ou adicionadas padrões de hidroxicloroquina e seus metabolitos em três níveis de solução (75, 750, 1600 ng/mL). O viés expresso como porcentagem foi obtido comparando o resultado da concentração esperada *versus* a obtida e considerada adequada se 20% ou menos.

3.5.8. Contaminação entre Amostras Sequenciais por Arraste

O arraste entre amostras foi determinado pela análise repetida de 10 alíquotas de amostra padrão de alta concentração (H) (2000 ng/mL) e 11 alíquotas de baixa concentração (L) (50 ng/mL) das duas matrizes na sequência seguinte: L (n = 3), H (n = 2), L (n = 1), H (n = 2), L (n = 4), H (n = 2), L (n = 1), H (n = 2), L (n=1), H (n = 2), L (n = 1). O grau de *carryover* foi calculado pela diferença da média das repostas do detector das amostras de concentração L após H menos a média de resposta do detector das amostras de concentração L após L. O limite de erro foi estabelecido como 3 vezes o desvio padrão das repostas do detector das amostras de concentração baixa após baixa. O *carryover* foi considerado aceitável se menos que o limite de erro do método

3.5.9. Ensaio de Validação de Diluição

Para estabelecer o fator de diluição para as amostras com concentração acima do limite superior de quantificação, uma amostra positiva para HCQ (3484 ng/mL) foi diluída em 1/2, 1/3, 1/4 e 1/5 usando sangue livre de droga. O experimento foi conduzido com cinco preparos para cada diluição. O viés expresso em porcentagem foi obtido comparando a concentração esperada *versus* a dosada e o CV foi obtido entre os 5 preparos. O fator de diluição foi considerado aceitável se o CV (%) e o viés (%) eram ambos 15% ou menos.

3.6.0. Análise Estatística

Para a análise estatística, foram utilizados os seguintes softwares Excel, Minitab 15.0 e EP Evaluator versão 9.0.

4. RESULTADOS

4.1. Desenvolvimento do Método

4.1.1. Detecção por Espectrometria de Massas

A otimização da detecção por espectrometria de massa foi realizada por meio da infusão dos analitos e seus respectivos padrões internos deuterados a 100 ng/mL em acetonitrila/água com 0,1% ácido fórmico diretamente no detector MS/MS num fluxo de 10 μ L/min. Ionização por eletropulverização em modo positivo produziu a melhor detecção para todos os analitos. Pelo menos duas transições foram usadas para construir um método de monitoramento de reação selecionada (SRM). Os íons quantificadores e qualificadores foram escolhidos para cada composto com base na abundância e estabilidade do pico e, além disso, considerando a consistência da razão de íons. A energia de colisão, a lente de RF, as temperaturas e a taxa de fluxo de gás de dessolvatação foram determinadas por otimização automática pela aplicação TSQ Altis Tune. Transições m/z (razão massa/carga) incluindo o íon precursor, o íon quantificador do produto e o íon qualificador do produto e a razão de íons para cada composto foram selecionados e apresentados em dados suplementares (Tabela S1).

4.1.2. Separação Cromatográfica e Extração em Linha

Para o desenvolvimento do método cromatográfico, foram testadas várias combinações de condições analíticas para a fase estacionária e a fase móvel. A combinação ideal em relação ao tempo de corrida, tempo de retenção, forma de pico e resposta MS foi obtida com acetato de amônio 25 mM (pH=4,5) como fase aquosa e metanol/acetonitrila (v/v) (70/30) como fase orgânica. O modo

isocrático de eluição testado no desenvolvimento não forneceu separação adequada dos compostos, de modo que a fase móvel foi bombeada em um modo gradiente de acordo com o programa de eluição descrito em dados suplementares (Tabela S2). A otimização adicional do perfil de cromatografia foi realizada variando o pH da fase aquosa utilizada tanto na SPE em linha quanto nas etapas de separação analítica, utilizando água (pH = 5,5), acetato de amônio 25mM (pH = 4,5) e formiato de amônio (pH = 3,5). A otimização resultou em uma separação mais precisa e detecção mais sensível para todos os analitos, como mostrado na Figura 1. O tempo de retenção variou de 4,05 a 6,99 minutos para HCQ, seus metabolitos e os respectivos padrões internos deuterados e foram registrados (Tabela de dados suplementares S1).

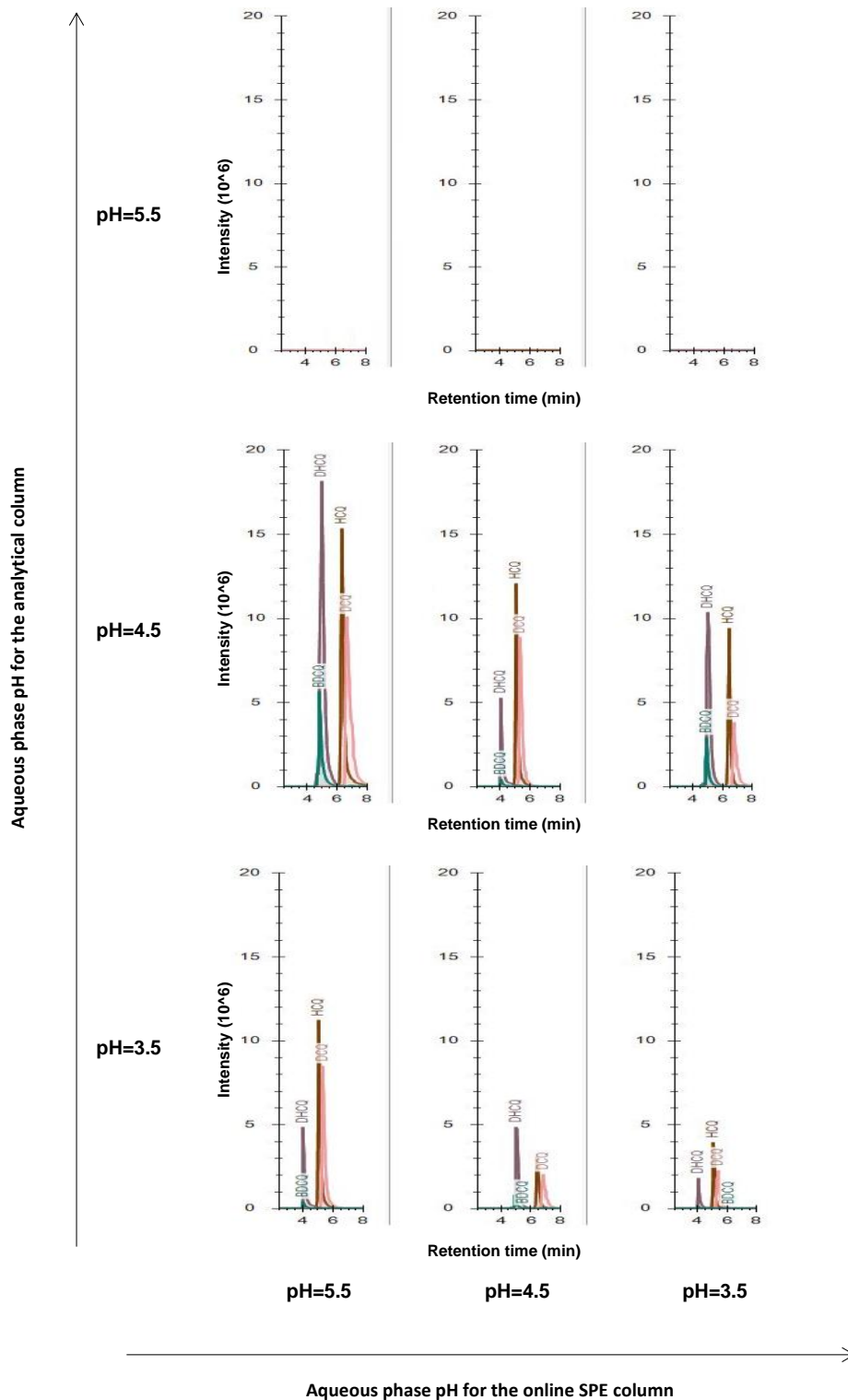


Figura 1- Efeito do pH na fase aquosa por UHPLC-MS/MS SPE (extração em fase sólida) em linha, BDCQ-Bidesetilcloroquina, DHCQ-desetilhidroxicloroquina, DCQ-Desetilcloroquina, HCQ-Hidroxicloroquina

4.2. Validação do Método

O limite inferior de quantificação para todos os analitos, incluindo HCQ e metabolitos, foi de 50,0 ng/ml tanto para o fluido oral como para o sangue total (Tabela 1).

Tabela 1- Limite inferior de quantificação para hidroxiclороquina e metabólitos no sangue e fluido oral

Compostos	Concentração (ng/ml)	Viés (%)	CV (%)
Hidroxiclороquina	50 (50)	15,7 (9,6)	1,1 (3,2)
Desetilclороquina	50 (50)	18,8 (5,3)	2,5 (8,8)
Bisdesetilclороquina	50 (50)	14,2 (8,3)	6,3 (11,4)
Desetilhidroxiclороquina	50 (50)	18,8 (10,9)	2,0 (5,3)

Os dados são expressos para o sangue total (fluido oral). CV: coeficiente de variação

As curvas de calibração foram lineares em uma faixa compreendida entre 50 e 2000 ng/mL para HCQ e metabólitos no sangue total e no fluido oral. Os valores do coeficiente de regressão (r^2) variaram entre 0,998 e 0,999, respectivamente, para o fluido oral e o sangue total, com erro sistemático de $\leq 15\%$ para cada nível nas curvas de calibração.

A precisão intra-ensaio em concentrações baixas, médias e altas mostrou um CV% $\leq 4,2\%$ para o fluido oral e $\leq 9,7\%$ para o sangue total (Tabela 2). Resultados semelhantes foram registrados para precisão inter-ensaio com CV% $\leq 14,8\%$ para fluido oral e $\leq 9,3\%$ para sangue total (Tabela 2). Os desvios globais das replicações em relação às suas concentrações nominais foram inferiores a 15%.

Tabela 2- Precisão intra e inter-ensaio em concentrações baixas, médias e altas de hidroxiclороquina e metabólitos no sangue total e fluido oral

Compostos	Intra-ensaio (n=20)		Inter-ensaio (n=20)	
	CV (%)	Bias (%)	CV (%)	Bias (%)
Hidroxiclороquina	5,3 (2,0)	0,2 (5,5)	3,5(9,5)	3,9 (0,3)
	3,3 (4,1)	2,4 (0,2)	7,5 (6,2)	2,7 (4,0)
	4,0 (4,2)	2,4 (1,3)	8,2 (5,2)	0,4 (10,0)
Desetilclороquina	9,7 (2,7)	0,7 (0,5)	1,2 (1,1)	7,7 (0,0)
	8,0 (1,8)	2,4 (5,5)	4,8 (7,9)	6,4 (11,2)
	9,6 (3,7)	3,2 (7,6)	7,2 (1,2)	21,0 (9,4)
Bisdeseticlороquina	6,6 (3,7)	2,8 (19,8)	1,5 (12,7)	3,5 (16,8)
	5,2 (4,2)	1,5 (1,8)	8,7 (4,8)	6,5 (0,1)
	3,4 (3,6)	0,8 (0,6)	4,9 (10,0)	2,9 (7,3)
Desetilhidroxiclороquina	2,9 (1,2)	0,5 (0,6)	8,0 (6,8)	2,0 (12,2)
	3,0 (1,8)	1,0 (3,7)	6,6 (14,2)	1,3 (14,8)
	3,1 (2,5)	2,0 (2,1)	9,3 (9,2)	1,1 (10,5)

Os dados são expressos para o sangue total (fluido oral) e de cima para baixo para concentrações Baixas, Médias e Altas, respectivamente. CV: coeficiente de variação

A recuperação foi avaliada em três amostras de níveis conhecidos, nas duas matrizes e ficou dentro de 80-120%, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3- Recuperação de hidroxiclороquina e metabólitos no sangue total e fluido oral

Concentrações	Média de recuperação (%)		
	150 ng/mL	750 ng/mL	1250 ng/mL
Hidroxiclороquina	112,8 (96,8)	102,7 (90,2)	113,3 (94,3)
Desetilclороquina	118,5 (104,5)	101,7 (93,1)	114,9 (95,2)
Bisdesetilclороquina	105,3 (85,3)	96,8 (93,7)	109,4 (89,5)
Desetilhidroxiclороquina	115,8 (101,0)	100,2 (97,0)	105,6 (97,0)

Os dados são expressos para o sangue (fluido oral)

O efeito matriz para HCQ e metabólitos nas concentrações de 75, 750 e 1600 ng/mL, foi mínimo (recuperações médias entre 84,1–116,1%) tanto para o fluido oral quanto para o sangue total, conforme descrito na Tabela 4. Nenhum interferente foi considerado significativo, pois as interferências endógenas ou exógenas não afetaram significativamente a concentração esperada ($\leq 20\%$) para todos os analitos. O DCQ foi uma exceção e mostrou uma pequena diferença entre a concentração esperada e a concentração obtida (21,3%) em amostras contendo até 19 mg/dL de hemoglobina (Tabela 5). A quantificação média das amostras de baixa concentração após baixa concentração foi de 113-160 ng/mL e a baixa concentração após alta concentração foi de 134-182 ng/mL. O reporte estimado foi de 14-22 ng/mL e o erro limite foi de 15-23 ng/mL para fluido oral e sangue total, de modo que o método foi considerado livre de arraste entre amostras.

Tabela 4- Efeito matriz para hidroxiclороquina e metabólitos no sangue total e fluido oral

Compostos	Efeito matriz (%)	
	Sangue total	Fluido oral
Hidroxiclороquina	90,1 (5,2)	98,2 (4,1)
	93,9 (8,6)	87,1 (5,0)
	110,0 (15,5)	111,4 (5,7)
Desetilclороquina	98,1 (4,2)	107,5 (3,3)
	97,6 (5,1)	91,0 (5,1)
	113,6 (15,9)	116,1 (7,1)
Bisdesetilclороquina	86,9 (3,2)	93,1 (3,8)
	93,2 (8,8)	84,1 (5,8)
	113,0 (20,9)	110,2 (6,3)
Desetilhidroxiclороquina	91,4 (3,5)	100,4 (3,5)
	91,9 (8,3)	84,5 (6,6)
	114,1 (15,6)	114,3 (4,1)

Os dados são expressos como média do efeito matricial obtido em amostras de 5 doadores (desvio padrão expresso em porcentagem). O efeito da matriz foi avaliado em 75, 750 e 1600 ng/mL, apresentados de cima para baixo para cada composto

Tabela 5- Avaliação de interferências para medição de hidroxiquina e metabólitos em sangue total

Compostos	Bilirrubina (4.4 mg/dL)	Hemoglobina (19 mg/dL)	Índice de hemólise (110 mg/dL)	Exógeno*
Hidroxiquina	1,2 (5,4)	5,2 (3,8)	3,1 (3,4)	6,6 (8,1)
Desetilcloroquina	1,5 (9,8)	21,3 (7,5)	5,8 (5,4)	8,2 (5,9)
Bisdesetilcloroquina	10,2 (11,2)	19,4 (21,8)	3,7 (13,9)	5,2 (6,8)
Desetilhidroxiquina	2,9 (5,4)	15,4 (6,6)	8,0 (3,1)	9,9 (7,1)

Os dados são expressos em % de viés (CV%) para cada composto. * interferências exógenas foram realizadas com amostras positivas contendo prednisolona (100 ng/mL), tacrolimo (6,3 ng/mL) e ácido micofenólico (2,4 µg/mL)

A diluição da amostra para concentrações superiores ao limite superior de quantificação foi devidamente validada até 1/5 de diluição. Todas as diluições apresentaram concentração adequada esperada *versus* obtida, bem como coeficiente de variação. O maior viés (13,7%) foi registrado com diluição 1/5 (CV 9,7%), e o menor viés (2,1%) foi obtido através de uma diluição 1/3 (CV 6,7%), que foi selecionada como a melhor diluição para amostras superiores ao limite superior de quantificação.

5. DISCUSSÃO

A monitorização terapêutica de drogas em fluido oral gerou recentemente interesse por ser uma amostragem fácil e não invasiva em comparação com a coleta de sangue. A facilidade de acesso a essa amostra permite uma coleta no melhor horário para diagnóstico, em locais remotos por pessoas sem treinamento ou até mesmo em casa²⁸. Portanto, ela tem sido proposta como uma boa alternativa para ao sangue como amostra diagnóstica.

Existem alguns métodos de LC-MS/MS reportados na literatura para a quantificação de HCQ e seus metabolitos em fluidos biológicos como sangue total²⁹⁻³², mas nenhum para fluido oral. Assim, nós fornecemos aqui um método LC-MS/MS sensível, seletivo e preciso para a determinação de HCQ e seus metabolitos em fluido oral e sangue total.

O método necessita de apenas dez microlitros de fluido oral ou sangue total, o que permite a possibilidade a ser aplicado para monitoramento terapêutico de drogas em alguns grupos, particularmente na população pediátrica e idosa e naqueles com fluido oral reduzido, como a síndrome de Sjögren^{33,34}. Para sangue total, nosso método apresenta o menor volume necessário em comparação com outros métodos publicados^{19,29-32}.

O uso da extração em fase sólida em linha reduziu o preparo da amostra para o método de limpeza mais simples possível, que consistiu em uma simples combinação do fluido oral ou sangue total com padrões internos, seguido de precipitação de proteínas com acetonitrila. Portanto, permite que um grande número de amostras seja preparado em um curto espaço de tempo no ambiente clínico. O método descrito anteriormente exigia procedimentos de preparação de amostras mais longos, incluindo etapas como correção de pH ou concentração de extrato por evaporação^{29,32}.

Realizar o monitoramento terapêutico de drogas no fluido oral pode ser um grande desafio ou mesmo inviável, dependendo do medicamento empregado e do ambiente clínico. Isso ocorre porque a distribuição do medicamento para o fluido oral é um processo fisiológico que pode ser influenciado pelas características físico-químicas e farmacocinéticas do fármaco, bem como algumas condições fisiopatológicas dos pacientes e outros fatores externos^{16,35}. Geralmente, moléculas básicas e não polares que apresentam baixo peso molecular e baixa ligação proteica apresentam correlação satisfatória entre fluidos orais e níveis sistêmicos, sendo candidatas ideais para o monitoramento salivar³⁵. A hidroxicloroquina satisfaz algumas dessas características, como peso molecular, LogP, Pka, ligação a proteínas e meia-vida que se mostraram favoráveis à excreção salivar^{16,36}. Para minimizar as questões relacionadas ao paciente, cuidados especiais precisam ser realizados antes da coleta de amostras, a fim de evitar a contaminação com alimentos, com resíduos de medicamentos deixados na cavidade oral após a dose tomada, bem como sangramento, o que pode afetar a concentração do medicamento. Outros fatores extrínsecos podem afetar o fluxo da taxa de saliva, incluindo medicamentos concomitantes, estado de hidratação, exposição à luz, estímulos olfativos e posição corporal³⁷. No entanto, é necessária uma avaliação específica para determinar se esses fatores afetam a concentração de medicamentos para cada caso individual.

Hidroxicloroquina é N-desalquilada pela CYP3A4 em desetilhidroxicloroquina, desetilcloroquina e bidesetilcloroquina. Apesar de suas estruturas semelhantes de 4-aminoquinolina-3, as desalquilações de cadeia lateral afetam seus comportamentos cromatográficos dentro da faixa de pH

usada para as fases móveis mais comuns de LC-MS. De acordo com a teoria solvofóbica³⁸, o pKa afeta a retenção, uma vez que as formas neutras têm uma afinidade relativamente maior com a fase estacionária apolar em comparação com a forma iônica do mesmo composto, que é mais solúvel na fase móvel. Além de influenciar a separação cromatográfica, o pH da fase móvel também afeta a ionização na espectrometria de massas e, portanto, a sensibilidade do ensaio. A otimização das eficiências de separação e sensibilidade para todos os analitos foi realizada por um experimento combinatório que avaliou o pH de diferentes fases móveis na primeira e segunda dimensões cromatográficas. O experimento demonstrou que o pH da fase móvel durante a extração on-line de fase sólida e durante a separação cromatográfica é um conjunto crítico para sensibilidade e eficiência no método relatado.

A preparação simplificada da amostra, seguida de extração on-line e a incorporação de padrões isótopos estáveis para todos os analitos, resultaram em precisão e exatidão adequadas, tanto no fluido oral quanto no sangue total. A recuperação foi adequada para ambas as matrizes, sugerindo que o procedimento de extração aqui apresentado é eficiente. Matrizes complexas, como o sangue total, podem levar a uma supressão significativa da ionização do sinal devido à presença de componentes que podem atuar como interferências que afetam a recuperação³⁹. No entanto, a recuperação não foi afetada para HCQ ou seus metabólitos no método aqui relatado. Uma avaliação mais aprofundada das interferências endógenas e exógenas confirmou esses dados, reforçando a eficiência da configuração aqui relatada, apesar de uma leve interferência da hemoglobina no sinal do DCQ, o que sugere cautela na coleta

de amostras de sangue para a mensuração desse analito, para evitar a interferência da hemólise.

Este método permitirá que estudos adicionais avaliem a correlação do sangue de HCQ *versus* os níveis de fluido oral em um ambiente clínico, bem como os níveis de metabólitos associados à eficácia ou toxicidade em pacientes com LES submetidos ao tratamento com HCQ. Estudos futuros também abordarão as concentrações terapêuticas de fluidos orais associados à adesão ao tratamento e aos pontos de corte para a predição de *flares*.

Outros estudos multicêntricos e multinacionais serão necessários para definir a relevância da quantificação dos metabólitos da HCQ e a viabilidade da monitorização desses analitos em fluido oral em um ambiente clínico.

6. CONCLUSÃO

Um método LC-MS/MS foi desenvolvido e validado, mostrando-se específico, preciso e com acurácia para determinar o intervalo analítico para fins de monitorização terapêutica da HCQ e seus metabolitos no fluido oral e sangue total.

7. REFERÊNCIAS

1. Schrezenmeier E, Dönner T. Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology. *Nat Rev Rheumatology*.2020;16:155-166.
2. Jorge AM, Melles RB, Zhang Y, Lu N, Rai SK, Young LH, et al. Hydroxychloroquine prescription trends and predictors for excess dosing per recent ophthalmology guidelines. *Arthritis Res Ther*. 2018;20:4–11.
3. Petri M. Use of hydroxychloroquine to prevent thrombosis in systemic lupus erythematosus and in antiphospholipid antibody-positive patients. *Curr Rheumatol Rep*. 2011;13:77–80.
4. Cairolì E, Rebella M, Danese N, Garra V, Borba EF. Hydroxychloroquine reduces low-density lipoprotein cholesterol levels in systemic lupus erythematosus: a longitudinal evaluation of the lipid-lowering effect. *Lupus*. 2012;21:1178–82.
5. Costedoat-Chalumeau N, Dunogu e B, Morel N, Le Guern V, Guettrot-Imbert G. Hydroxychloroquine: A multifaceted treatment in lupus. *Press Medicale [Internet]*. Elsevier Masson SAS; 2014;43:e167–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lpm.2014.03.007>.
6. Stamp LK, Barclay M. Therapeutic drug monitoring in rheumatic diseases: Utile or futile? *Rheumatol (United Kingdom)*. 2014;53:988–97.
7. Costedoat-Chalumeau N, Amoura Z, Hulot JS, Hammoud HA, Aymard G, Cacoub P, et al. Low blood concentration of hydroxychloroquine is a marker for and predictor of disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006;54:3284–90.
8. Costedoat-Chalumeau N, Amoura Z, Duhaut P, Huong DLT, Sebbough D, Wechsler B, et al. Safety of Hydroxychloroquine in Pregnant Patients With Connective Tissue Diseases: A Study of One Hundred Thirty-Three Cases Compared With a Control Group. *Arthritis Rheum*. 2003;48(11):3207-11.
9. Costedoat-Chalumeau N, Amoura Z, Hulot JS, Aymard G, Leroux G, Marra D, et al. Very low blood hydroxychloroquine concentration as an objective marker of poor adherence to treatment of systemic lupus

- erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:821–4.
10. Munster T, Gibbs JO, Shen D, Baethge BA, Botstein GR, Caldwell J, et al. Hydroxychloroquine concentration–response relationships in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2002;46(6):1460-69.
 11. Ding HJ, Denniston AK, Rao VK, Gordon C. Hydroxychloroquine-related retinal toxicity. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2016;55:957–67.
 12. Marmor MF, Kellner U, Lai TYY, Lyons JS, Mieler WF. Revised Recommendations on Screening for Chloroquine and Hydroxychloroquine Retinopathy. *Ophthalmology*. 2011;118(2):415–22.
 13. Drummer OH. Introduction and review of collection techniques and applications of drug testing of oral fluid. *Ther Drug Monit*. 2008;30:203–6.
 14. Kiang TKL, Ranamukhaarachchi SA, Ensom MHH. Revolutionizing therapeutic drug monitoring with the use of interstitial fluid and microneedles technology. *Pharmaceutics*. 2017;9(43): doi:10.3390/pharmaceutics9040043.
 15. Aboujaoude S, Masri M, Rizk S, Chamat S, Farha J, Majzoub Z. Could salivary cyclosporine dosage replace the whole blood cyclosporine measurements in renal transplant patients? *J Int Soc Prevent Comm dent*. 2017;7(3):136-140.
 16. Hutchinson L, Sinclair M, Reid B, Burnett K, Callan B. A descriptive systematic review of salivary therapeutic drug monitoring in neonates and infants. *Br J Clin Pharmacol*. 2018: doi:10.1111/bcp.13553.
 17. Avataneo V, D'Avolio A, Cusato J, Cantù M, De Nicolò A. LC-MS application for therapeutic drug monitoring in alternative matrices. *J Pharm Biomed Anal*. 2019;166:40–51.
 18. Füzéry AK, Breaud AR, Emezienna N, Schools S, Clarke WA. A rapid and reliable method for the quantitation of hydroxychloroquine in serum using turbulent flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2013;421:79–84.

-
19. Wang LZ, Ong RYL, Chin TM, Thuya WL, Wan SC, Wong ALA, et al. Method development and validation for rapid quantification of hydroxychloroquine in human blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2012;61:86–92.
 20. Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, James J, Frampton C, et al. Methotrexate polyglutamate concentrations are not associated with disease control in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate therapy. *Arthritis Rheum.* 2010;62(2):359-68.
 21. Askanase AD, Wallace DJ, Weisman MH, Tseng CE, Bernstein L, Belmont HM, et al. Use of pharmacogenetics, enzymatic phenotyping, and metabolite monitoring to guide treatment with azathioprine in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2009;36(1):89-95.
 22. Dervieux T, Greenstein N, Kremer J. Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(10):3095-103.
 23. CLSI. Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. CLSI Doc. EP17-A. 2004.
 24. Donald H. Chace, John R. Barr, Mark W. Duncan, Dietrich Matern, Michael R. Morris, Darryl Erik Palmer-Toy, et al. Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory: General Principles and Guidance; Proposed Guideline. CLSI. 2007.
 25. CLSI Document. CLSI EP06-A Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. Wayne PAL Clin. Lab. Stand. Inst. 2003.
 26. Carey R, Anderson F, George H, Hartmann A, Janzen V, Kallner A, et al. User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP15-A2. CLSI Doc EP15-A2. 2006.
 27. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the

- Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.* 2003;75:3019-30.
28. Hofman LF. Human oral fluid as a diagnostic specimen. *J Nutr.* 2001;131(5):1621S-5S.
29. Charlier B, Pingeon M, Dal Piaz F, Conti V, Valentini G, Filippelli A, et al. Development of a novel ion-pairing HPLC-FL method for the separation and quantification of hydroxychloroquine and its metabolites in whole blood. *Biomed Chromatogr.* 2018;32:1–10.
30. Qu Y, Noe G, Breaud AR, Vidal M, Clarke WA, Zahr N, et al. Development and validation of a clinical HPLC method for the quantification of hydroxychloroquine and its metabolites in whole blood. *Futur Sci OA.* 2015;1(3):FS026. doi: 10.4155/fso.15.24.
31. Chhonker YS, Sleightholm RL, Li J, Oupický D, Murry DJ. Simultaneous quantitation of hydroxychloroquine and its metabolites in mouse blood and tissues using LC–ESI–MS/MS: An application for pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2018;1072:320–7.
32. Soichot M, Mégarbane B, Houzé P, Chevillard L, Fonsart J, Baud FJ, et al. Development, validation and clinical application of a LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of hydroxychloroquine and its active metabolites in human whole blood. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;100:131–7.
33. Stone J. A practical guide to sample preparation for liquid chromatography-tandem mass spectrometry in clinical research and toxicology. *Article.* 2018;30(6):15-21.
34. Al-Hashimi I. Xerostomia secondary to Sjögren's syndrome in the elderly recognition and management. *Drugs and Aging.* 2005;22(11):887-99.
35. Idkaidek, N. M. Comparative assessment of saliva and plasma for drug bioavailability and bioequivalence studies in humans. *Saudi Pharm. J.* 2017; 25(5):671-675.

-
36. Furst, D. E. Pharmacokinetics of hydroxychloroquine and chloroquine during treatment of rheumatic diseases. *Lupus*. 1996;5 Suppl 1:S11-5.
 37. Lima, D. P., Diniz, D. G., Moimaz, S. A. S., Sumida, D. H. & Okamoto, A. C. Saliva: reflection of the body. *Int. J. Infect. Dis.* 2010; 14(3):e184-8.
 38. Horváth C, Melander W, Molnár I. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *J Chromatogr A*. 1976;125(1):129-156.
 39. Hall TG, Karen IS, Bresciano R, Wang Y, McKearn D, Savage RE. (2012). Identifying and Overcoming Matrix Effects in Drug Discovery and Development, *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*, Dr Jeevan Prasain (Ed.), ISBN: 978-953-51-0141-3, InTech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/tandem-mass-spectrometry-applications-andprinciples/identifying-and-overcoming-matrix-effects-in-drug-discovery-and-development>.

8. APÊNDICES

Dados Suplementares

Tabela S1- Parâmetros MS/MS e tempos de retenção típicos para a hidroxiclороquina, metabolitos e as respectivas normas internas marcadas com isótopos estáveis

Compostos	Tempo de retenção (min)	Ion precursor (m/z)	* Ion produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Tensão da lente do tubo (V)	Razão de íons
Hidroxiclороquina	6,3 ± 0,1	336,2	247,0; 158,0	21,5; 22,9	84,0; 84,0	17,0
Hidroxiclороquina-D4	6,3 ± 0,1	340,2	251,0; 162,0	21,4; 24,4	88,0; 88,0	16,5
Desetilclороquina	6,7 ± 0,1	292,2	247,0; 114,0	19,2; 20,9	103,0; 103,0	111,7
Desetilclороquina-D4	6,7 ± 0,1	296,2	251,0; 118,0	19,4; 21,5	81,0; 81,0	137,4
Bisdeseticlороquina	4,9 ± 0,1	264,1	247,0; 86,0	18,9; 21,1	77,0; 77,0	194,2
Bisdeseticlороquina -D4	4,9 ± 0,1	268,1	251,0; 90,0	19,1; 21,5	89,0; 89,0	51,7
Desetilhidroxiclороquina	5,0 ± 0,1	308,1	247,0; 130,0	20,0; 21,3	86,0; 86,0	107,8
Desetilhidroxiclороquina-D4	5,0 ± 0,1	312,1	251,0; 134,0	20,4; 22,0	90,0; 90,0	98,4

Tabela S2- Programa de limpeza eluição em SPE em linha

Tempo min	Fluxo mL/min	Solução A %	Solução B %
Condição inicial	1,0	100,0	0,0
0,0	1,0	100,0	0,0
5,0	1,0	100,0	0,0
5,2	1,0	15,0	85,0
9,8	1,0	14,0	86,0
10,0	1,0	100,0	0,0
12,0	Parada da corrida		

Limpeza on-line SPE otimizada com coluna Dionex™ SolEx™ HRP, 2,1x20mm, 12-14um ajustada a 40°C e eluída com uma mistura de fases orgânica e aquosa. Solução A: Água. Solução B: Metanol/Acetonitrila/H2O/0,5% Ácido fórmico

Tabela S3- Programa de eluição de gradiente

Tempo min	Fluxo mL/min	Solução A %	Solução B %
Initial condition	0,4	68,0	32,0
0,0	0,4	68,0	32,0
2,0	0,4	68,0	32,0
7,0	0,4	14,0	86,0
8,0	0,4	14,0	86,0
8,5	0,4	0,0	100,0
10,5	0,4	68,0	32,0
10,7	0,4	68,0	32,0
12,0	Parada da corrida		

Método cromatográfico otimizado 50X 2,1mmX 2,6µm Accucore™ PFP A. acoplado a uma coluna de proteção de 2,1x20 mm (Cartucho de Guarda de Segurança C18 Phenomenex, Torrance, CA, EUA). fixada a 40°C e eluída com uma mistura de fases orgânica e aquosa. Solução A: Água. Solução B: Metanol/Acetonitrila/H2O/0,5% de ácido fórmico. Volume injetado 40 µL.