

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Leandro Schiavo Vilhena

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA  
DETERMINAÇÃO DE SOFOSBUVIR E SEU PRINCIPAL METABÓLITO (GS-  
331007) EM PLASMA, LÍQUOR E FLUIDO SEMINAL POR LC-MS/MS E  
APLICAÇÃO A UM ENSAIO PILOTO COM FOCO EM ZIKA**

RIO DE JANEIRO

2022

Leandro Schiavo Vilhena

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA  
DETERMINAÇÃO DE SOFOSBUVIR E SEU PRINCIPAL METABÓLITO (GS-  
331007) EM PLASMA, LÍQUOR E FLUIDO SEMINAL POR LC-MS/MS E  
APLICAÇÃO A UM ENSAIO PILOTO COM FOCO EM ZIKA

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Dra. Laís Bastos da Fonseca  
Dr. Fábio Coelho Amendoeira

Rio de Janeiro

2022

Catálogo na Fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Vilhena, Leandro Schiavo

Desenvolvimento e validação de metodologias para determinação de sofosbuvir e seu principal metabólito (GS-331007) em plasma, líquido e fluido seminal por LC-MS/MS e aplicação a um ensaio piloto com foco em Zika. / Leandro Schiavo Vilhena. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2022.

183 f. : il. ; fig. ; graf. ; tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

Orientador: Fábio Coelho Amendoeira.

Co-orientadora: Laís Bastos da Fonseca.

1. Sofosbuvir. 2. GS-331007. 3. Matrizes biológicas. 4. LC-MS/MS. 5. Zika. I. Título.

Development and validation of LC-MS/MS methods for the simultaneous quantification of sofosbuvir and its major metabolite (GS-331007) in blood plasma, cerebrospinal, and seminal fluid: application to a pilot clinical trial with a focus on Zika.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Leandro Schiavo Vilhena

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA  
DETERMINAÇÃO DE SOFOSBUVIR E SEU PRINCIPAL METABÓLITO (GS-  
331007) EM PLASMA, LÍQUOR E FLUIDO SEMINAL POR LC-MS/MS E  
APLICAÇÃO A UM ENSAIO PILOTO COM FOCO EM ZIKA**

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 01/12/2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

(Doutor) Bernardete Ferraz Spisso

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz.

---

(Doutor) Yara Peluso Cid

Faculdade de Farmácia - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

---

(Doutor) Jorge Carlos Santos da Costa

Presidência - Fundação Oswaldo Cruz.

**ORIENTADORES**

---

(Doutor) Laís Bastos da Fonseca

Serviço de Farmacocinética - Fundação Oswaldo Cruz.

---

(Doutor) Fábio Coelho Amendoeira

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, que me deu forças para seguir essa jornada.

Agradeço à minha mãe, Ione, que esteve presente no início dessa caminhada e que agora está vibrando lá do céu. Sou eternamente grato pelo amor incondicional, dedicação incansável aos filhos e pelo exemplo de garra e determinação. Sem ela, eu não teria chegado até aqui.

Agradeço aos meus irmãos, Igor, Marina e Silvia, pelo apoio, paciência e compreensão em todos os momentos. Sem o apoio de vocês, essa conquista não seria possível. Um por todos, todos por um!

Agradeço ao meu namorado, Jader, por todo amor, companheirismo, compreensão e paciência desde o princípio.

Agradeço aos meus cunhados, Guilherme e Bernardo, pela presença constante e carinho dispensados a mim.

Agradeço à família Schiavo pelo carinho e amor. Em especial, agradeço ao meu avô Zinho e minha avó Neide, que, junto com minha mãe, Ione, mostraram a importância dos estudos e lá do céu estão radiantes por mais essa conquista. Agradeço à minha madrinha, Patrícia, e às tias Angela, Cláudia, Ivone e Sandra; agradeço ao meu padrinho, Marcos, e aos tios Adalberto (*in memorian*), Angelo (*in memorian*) e Pedro (*in memorian*).

Agradeço aos meus amigos, Pedro, Lucas e Leonardo, pela amizade desde os primórdios das nossas vidas.

Agradeço à minha amiga Fabiana Almeida, pelo enorme apoio desde a época da iniciação científica. Sempre solícita e disposta a ajudar. Minha eterna gratidão.

Agradeço aos meus amigos Junior e Marçal pelo incentivo, apoio e pela torcida.

Agradeço aos meus amigos Carlos, Emanuel e Elias pelas risadas e conversas descontraídas. Em especial, agradeço ao Carlos pela ajuda no GraphPad Prism.

Agradeço ao meu amigo Marcelo pelo ombro amigo e torcida pelo meu êxito.

Agradeço aos meus amigos Willian e Pedro pela amizade fraterna e pelo incentivo constante.

Agradeço ao meu fisioterapeuta, acupunturista e osteopata, Rafael Redovalio, pelo tratamento, que tanto me ajudou ao longo dessa jornada.

Agradeço à minha orientadora e chefe, Dra. Laís Bastos da Fonseca, pelos ensinamentos e por todo o suporte, fornecendo todas as condições necessárias para o pleno desenvolvimento deste trabalho. Seu exemplo de profissionalismo, competência e ética serão sempre uma referência.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Fábio Coelho Amendoeira, pela oportunidade e confiança de sempre.

Agradeço aos meus chefes, Dr. Douglas Pereira Pinto e Dra. Aline Campos de Azevedo da Silva, por todo o conhecimento transmitido e apoio na condução deste projeto.

Agradeço aos meus amigos do SEFAR, Adelaine, Bárbara, Carine, Diego, Elen, Estephane, Gabriel, Heliana, Jéssica, João, Joyce, Layza, Letícia, Marco, Nanashara, Pedro Henrique, Pedro Ivo, Tatiane, Viviane e Valéria pelo auxílio e prazerosa convivência diária.

Agradeço ao Colégio Batista Mineiro pelos conhecimentos transmitidos, que foram fundamentais para abrir as portas do caminho do desenvolvimento.

Agradeço à UFMG e aos amigos que fiz na graduação. Em especial, agradeço ao meu primeiro orientador, Dr. Carlos Alberto Tagliati, pela confiança e pelos conhecimentos transmitidos.

Agradeço ao corpo docente e colaboradores do programa de pós-graduação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fiocruz por proporcionarem o curso de Pós-graduação no INCQS. Em especial, agradeço à Dra. Katia Christina Leandro pelo zelo e dedicação aos alunos.

Agradeço à população brasileira, que, por meio dos impostos pagos, tornou possível essa Pós-graduação integralmente gratuita e de qualidade.

O obstáculo é o caminho.

Ryan Holiday

## RESUMO

O Zika vírus (ZIKV) ainda é uma ameaça à saúde global, pois, até o momento, inexistente medicamento e vacina, podendo causar severos comprometimentos neurológicos como microcefalia e Síndrome de Guillain-Barré (SGB). Apesar da principal via de transmissão ser a picada do mosquito *Aedes*, a transmissão sexual da doença merece ser considerada devido à grande persistência viral em fluido seminal. Recentes publicações (2017 - 2020) sinalizaram resultados promissores com o sofosbuvir, um antiviral para Hepatite C. Então, esta pesquisa objetivou desenvolver e validar metodologias (conforme Resolução da ANVISA para validação de metodologias bioanalíticas, RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 ) por LC-MS/MS para apurar a concentração de sofosbuvir e seu principal metabólito (GS-331007) em plasma, líquido e fluido seminal humanos e aplicar as metodologias na análise de amostras de um ensaio clínico piloto pioneiro com foco em Zika. O ensaio foi realizado em duas etapas, sendo coletadas amostras nos tempos de 01h:30min e 5h:00min após a administração de um comprimido do medicamento Sovaldi® (400 mg de sofosbuvir). As análises foram realizadas utilizando colunas C18 com a fase móvel composta por solução aquosa de ácido fórmico 0,1 % e metanol:acetonitrila (80:20, v/v). As quantificações foram realizadas em modo positivo utilizando a estratégia de padronização interna. As seguintes relações *m/z* foram monitoradas: sofosbuvir *m/z* 530.1>242.8; GS-331007 *m/z* 260.9>112.9; cimetidina *m/z* 253.2>117.2 (padrão interno); zidovudina *m/z* 267.9>127.0 (padrão interno) e diazepam *m/z* 285.2>193.0 (padrão interno). Previamente à injeção no sistema, as amostras foram extraídas com éter etil-terc-butílico e acetato de etila conforme procedimento desenvolvido e validado. Para quantificação, foram empregadas as seguintes curvas de calibração ponderadas  $1/x^2$  (ng/mL): plasma - 0,50 – 2000 para o sofosbuvir e 2 – 2000 para o GS-331007; líquido - 0,50 – 100 para o sofosbuvir e 5 – 200 para o GS-331007; fluido seminal - 0,50 – 100 para o sofosbuvir e 10 – 1500 para o GS-331007. As metodologias seguiram as especificações da Resolução da ANVISA e foram aplicadas com sucesso ao ensaio piloto.

**Palavras-chave:** Sofosbuvir. GS-331007. Matrizes biológicas. LC-MS/MS. Zika.

## ABSTRACT

Zika is a disease transmitted mainly by the mosquito bite of the genus *Aedes*, but sexual transmission has also been described. Given its association with severe conditions (microcephaly and Guillain-Barré Syndrome) and the absence of a vaccine or a specific treatment, Zika is still a threat to public global health. Recent studies (2017 - 2020) revealed encouraging findings with sofosbuvir, an anti-hepatitis C agent. Then, this work aimed to develop and validate LC-MS/MS methods (according to ANVISA's Resolution for bioanalytical method validation, RDC nº 27, May 17, 2012) to determine the concentration of sofosbuvir and its main metabolite (GS-331007) in human matrices (plasma, cerebrospinal and seminal fluids) and apply the methods in the analysis of samples from a pioneer Clinical Pilot Study with a focus on Zika. The clinical trial was performed in two different times in which samples of blood, cerebrospinal (CSF) and seminal fluid (SF) were collected at the times of 01h:30min and 5h:00min after the administration of a tablet of Sovaldi® (sofosbuvir 400 mg). The analysis was performed using C18 columns with 0.1% formic acid in water and methanol-acetonitrile (80:20, v/v) as the mobile phase. The spectrometer was operated in positive mode and the quantifications were performed with internal standards (IS). The following  $m/z$  ratios were monitored: sofosbuvir  $m/z$  530.1>242.8; GS-331007  $m/z$  260.9>112.9; cimetidina  $m/z$  253.2>117.2 (IS); zidovudina  $m/z$  267.9>127.0 (IS) and diazepam  $m/z$  285.2>193.0 (IS). Before LC-MS/MS injection, an optimized liquid-liquid extraction procedure with tert-butyl methyl ether and ethyl acetate was performed. The following weighted calibration curves  $1/x^2$  were used for the quantification in each human matrix (ng/mL): plasma - 0.50 – 2000 for sofosbuvir and 2 – 2000 for GS-331007; CSF - 0.50 – 100 for sofosbuvir and 5 – 200 for GS-331007; SF - 0.50 – 100 for sofosbuvir and 10 – 1500 for GS-331007. The methods complied with all requirements of the ANVISA's Resolution and were successfully applied to the pilot trial.

**Keywords:** Sofosbuvir. GS-331007. Biological matrices. LC-MS/MS. Zika.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Biotransformação do sofosbuvir.....	30
Figura 2 - Esquema básico de um sistema de cromatografia líquida .....	35
Figura 3 - O analisador e a formação do espectro de massas .....	36
Figura 4 - Sistema de cromatografia acoplado ao espectrômetro de massas.....	36
Figura 5 - Espectro analítico das técnicas ESI, APPI e APCI.....	37
Figura 6 - O processo da ionização por eletrospray (ESI).....	38
Figura 7 - Analisador do tipo quadrupolo .....	39
Figura 8 - Analisador triplo quadrupolo .....	40
Figura 9 - Escaneamentos no analisador triplo quadrupolo (QQQ).....	41
Figura 10 - Principais métodos de extração em estudos farmacocinéticos .....	44
Figura 11 - Tipos de amostra utilizadas na validação de métodos bioanalíticos.....	67
Figura 12 - Fórmula estrutural do sofosbuvir.....	77
Figura 13 - Fórmula estrutural do metabólito GS-331007 .....	77
Figura 14 - Fórmula estrutural da cimetidina .....	78
Figura 15 - Fórmula estrutural da famotidina.....	78
Figura 16 - Fórmula estrutural da zidovudina .....	79
Figura 17 - Fórmula estrutural do diazepam .....	79
Figura 18 - Fórmula estrutural da nicotina.....	80
Figura 19 - Fórmula estrutural da cafeína .....	80
Figura 20 - Espectro do íon precursor do sofosbuvir em modo positivo.....	84
Figura 21 - Espectro do íon produto do sofosbuvir em modo positivo.....	84
Figura 22 - Espectro do íon precursor do GS-331007 em modo positivo.....	85
Figura 23 - Espectro do íon produto do GS-331007 em modo positivo.....	85
Figura 24 - Espectro do íon precursor da cimetidina em modo positivo.....	86
Figura 25 - Espectro do íon produto da cimetidina em modo positivo.....	86
Figura 26 - Espectro do íon precursor da zidovudina em modo positivo.....	87
Figura 27 - Espectro do íon produto da zidovudina em modo positivo.....	87
Figura 28 - Espectro do íon precursor do diazepam em modo positivo .....	88
Figura 29 - Espectro do íon produto do diazepam em modo positivo .....	88
Figura 30 - Amostra de plasma. Coluna Gemini NX-C18, 50 mm. Fase móvel: 50 % acetonitrila + 50 % de água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v) - (1): sofosbuvir; (2): GS- 331007; (3): PI (cimetidina) .....	93

Figura 31 - Amostra de plasma. Coluna Gemini C18, 150 mm. Fase móvel: 50 % acetonitrila + 50 % de água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v) - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (cimetidina) .....	94
Figura 32 - Amostra de plasma. Coluna ACE C8, 100 mm. Fase móvel: 50 % acetonitrila + 50 % de água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v) - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (cimetidina) .....	94
Figura 33 - Amostra de plasma. Coluna Gemini NX-C18, 50 mm. Fase móvel: 65 % (metanol:acetonitrila, 80:20 v/v) + 35 % de água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v). Coluna em 45 °C - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (cimetidina) .....	96
Figura 34 - Amostra de líquido. Coluna Gemini C18, 150 mm. Fase móvel: 68 % (metanol:acetonitrila, 80:20 v/v) + 32 % de água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v). Coluna em 45 °C - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (zidovudina) .....	98
Figura 35 - Amostra de fluido seminal. Coluna Gemini C18, 150 mm. Fase móvel: 68 % (metanol:acetonitrila, 80:20 v/v) + 32 % de água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v). Coluna em 22 °C - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007 e interferente (2,38 min.); (3): PI (diazepam) .....	99
Figura 36 - Protocolo de extração por precipitação de proteínas - plasma .....	101
Figura 37 - Protocolo de extração líquido-líquido - plasma .....	103
Figura 38 - Plasma - baixa concentração (sofosbuvir = 1,50 ng/mL e GS-331007 = 5,00 ng/mL). Solução de extração TBME:acetato de etila (70:30, v/v) - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (cimetidina) .....	104
Figura 39 - Plasma - alta concentração (sofosbuvir = 1600,00 ng/mL e GS-331007 = 1600,00 ng/mL). Solução de extração TBME:acetato de etila (70:30, v/v) - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (cimetidina) .....	104
Figura 40 - Protocolo de extração líquido-líquido - líquido .....	106
Figura 41 - Protocolo de extração líquido-líquido - fluido seminal .....	107
Figura 42 - Líquor - baixa concentração (sofosbuvir = 1,50 ng/mL e GS-331007 = 10,00 ng/mL). Solução de extração acetato de etila - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (zidovudina) .....	108
Figura 43 - Líquor - alta concentração (sofosbuvir = 80,00 ng/mL e GS-331007 = 150,00 ng/mL). Solução de extração acetato de etila - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (zidovudina) .....	108
Figura 44 - Fluido seminal - baixa concentração (sofosbuvir = 1,50 ng/mL e GS-331007 = 25,00 ng/mL). Solução de extração acetato de etila - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007;	

(3): PI (diazepam).....	109
Figura 45 - Fluido seminal - alta concentração (sofosbuvir = 80,00 ng/mL e GS-331007 = 1200,00 ng/mL). Solução de extração acetato de etila - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (diazepam).....	109
Figura 46 - Branco de plasma - (1): sofosbuvir ( $t_r = 1,16$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 0,69$ min); (3): PI (cimetidina, $t_r = 0,50$ min).....	110
Figura 47 - Branco de líquido - (1): sofosbuvir ( $t_r = 2,77$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,75$ min); (3): PI (zidovudina, $t_r = 2,00$ min).....	111
Figura 48 - Branco de fluido seminal - (1): sofosbuvir ( $t_r = 3,34$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,82$ min); (3): PI (diazepam, $t_r = 5,99$ min). ....	111
Figura 49 - LIQ em plasma (ng/mL) sofosbuvir = 0,50; GS-331007 = 2,00 - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (cimetidina) .....	114
Figura 50 - LIQ em líquido (ng/mL) sofosbuvir = 0,50; GS-331007 = 5,00 - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (zidovudina) .....	114
Figura 51 - LIQ em Fluido seminal (ng/mL) sofosbuvir = 0,50; GS-331007 = 10,00 - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (diazepam) .....	115
Figura 52 - Branco de plasma normal 1 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 1,16$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 0,69$ min); (3): PI (cimetidina, $t_r = 0,50$ min).....	120
Figura 53 - Branco de plasma normal 2 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 1,16$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 0,69$ min); (3): PI (cimetidina, $t_r = 0,50$ min).....	121
Figura 54 - Branco de plasma normal 3 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 1,16$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 0,69$ min); (3): PI (cimetidina, $t_r = 0,50$ min).....	121
Figura 55 - Branco de plasma normal 4 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 1,16$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 0,69$ min); (3): PI (cimetidina, $t_r = 0,50$ min).....	122
Figura 56 - Branco de plasma lipêmico 5 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 1,16$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 0,69$ min); (3): PI (cimetidina, $t_r = 0,50$ min).....	122
Figura 57 - Branco de plasma hemolisado 6 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 1,16$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 0,69$ min); (3): PI (cimetidina, $t_r = 0,50$ min).....	123
Figura 58 - Branco de líquido 1 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 2,77$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,75$ min); (3): PI (zidovudina, $t_r = 2,00$ min).....	124
Figura 59 - Branco de líquido 2 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 2,77$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,75$ min); (3): PI (zidovudina, $t_r = 2,00$ min).....	125
Figura 60 - Branco de líquido 3 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 2,77$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,75$ min); (3): PI (zidovudina, $t_r = 2,00$ min).....	125

Figura 61 - Branco de líquido 4 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 2,77$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,75$ min); (3): PI (zidovudina, $t_r = 2,00$ min).....	126
Figura 62 - Branco de líquido 5 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 2,77$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,75$ min); (3): PI (zidovudina, $t_r = 2,00$ min).....	126
Figura 63 - Branco de líquido 6 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 2,77$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,75$ min); (3): PI (zidovudina, $t_r = 2,00$ min).....	127
Figura 64 - Branco de fluido seminal 1 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 3,34$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,82$ min); (3): PI (diazepam, $t_r = 5,99$ min) .....	128
Figura 65 - Branco de fluido seminal 2 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 3,34$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,82$ min); (3): PI (diazepam, $t_r = 5,99$ min) .....	129
Figura 66 - Branco de fluido seminal 3 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 3,34$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,82$ min); (3): PI (diazepam, $t_r = 5,99$ min) .....	129
Figura 67 - Branco de fluido seminal 4 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 3,34$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,82$ min); (3): PI (diazepam, $t_r = 5,99$ min) .....	130
Figura 68 - Branco de fluido seminal 5 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 3,34$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,82$ min); (3): PI (diazepam, $t_r = 5,99$ min) .....	130
Figura 69 - Branco de fluido seminal 6 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 3,34$ min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,82$ min); (3): PI (diazepam, $t_r = 5,99$ min) .....	131
Figura 70 - Sofosbuvir em plasma e LCR - concentração .....	154
Figura 71 - GS-331007 em plasma e LCR - concentração .....	157
Figura 72 - GS-331007 - razão de penetração no SNC .....	157
Figura 73 - Sofosbuvir em plasma e FS - concentração .....	160
Figura 74 -Sofosbuvir - razão de penetração no FS.....	161
Figura 75 - GS-331007 em plasma e FS - concentração .....	164
Figura 76 - GS-331007 - razão de penetração no FS .....	164

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados farmacocinéticos do sofosbuvir e GS-331007 obtidos por análise não compartimental (dose única de 400 mg de sofosbuvir (Sovaldi®) a humanos saudáveis).....	31
Tabela 2 - Equipamentos gerais, instrumentos e consumíveis .....	51
Tabela 3 - Componentes, equipamentos e colunas cromatográficas.....	52
Tabela 4 - Substâncias químicas de referência.....	52
Tabela 5 - Medicamento de referência.....	53
Tabela 6 - Reagentes utilizados no trabalho .....	53
Tabela 7 - Dados dos analitos, padrões internos e potenciais interferentes .....	76
Tabela 8 - Parâmetros do espectrômetro de massas para as transições iônicas selecionadas para quantificação .....	90
Tabela 9 - Parâmetros da fonte ESI - Injeção em fluxo (FIA).....	91
Tabela 10 - Condições de análise em plasma.....	97
Tabela 11 - Condições de análise em líquido .....	99
Tabela 12 - Condições de análise em fluido seminal .....	100
Tabela 13 - Sofosbuvir em plasma, líquido e fluido seminal - LIQ: CV e exatidão....	113
Tabela 14 - GS-331007 em plasma, líquido e fluido seminal - LIQ: CV e exatidão ..	113
Tabela 15 - Sofosbuvir - curva em plasma, líquido e fluido seminal .....	117
Tabela 16 - GS-331007 - curva em plasma, líquido e fluido seminal.....	117
Tabela 17 - Sofosbuvir - controles em plasma, líquido e fluido seminal .....	118
Tabela 18 - GS-331007 - controles em plasma, líquido e fluido seminal .....	118
Tabela 19 - Plasma - Área e (%) interferência .....	123
Tabela 20 - Plasma com interferentes - Área e (%) interferência.....	124
Tabela 21 - Líquor - Área e (%) interferência .....	127
Tabela 22 - Líquor com interferentes - Área e (%) interferência.....	128
Tabela 23 - Fluido seminal - Área e (%) interferência .....	131
Tabela 24 - Fluido seminal com interferentes - Área e (%) interferência.....	132
Tabela 25 - Plasma - FMN, média e CV.....	133
Tabela 26 - Plasma com interferentes - FMN, média e CV .....	134
Tabela 27 - Líquor - FMN, média e CV .....	135
Tabela 28 - Líquor com interferentes - FMN, média e CV .....	136
Tabela 29 - Fluido seminal - FMN, média e CV.....	137

Tabela 30 - Fluido seminal com interferentes - FMN, média e CV .....	138
Tabela 31 - Área dos brancos, LIQ e LSQ e % de arraste .....	139
Tabela 32 - Sofosbuvir e GS-331007 em plasma, LCR e FS - curvas de calibração bioanalíticas .....	140
Tabela 33 - Sofosbuvir em plasma - Controles: média, CV e exatidão .....	142
Tabela 34 - GS-331007 em plasma - Controles: média, CV e exatidão .....	142
Tabela 35 - Sofosbuvir em líquido - Controles: média, CV e exatidão .....	143
Tabela 36 - GS-331007 em líquido - Controles: média, CV e exatidão .....	143
Tabela 37 - Sofosbuvir em fluido seminal - Controles: média, CV e exatidão .....	144
Tabela 38 - GS-331007 em fluido seminal - Controles: média, CV e exatidão .....	144
Tabela 39 - Sofosbuvir em plasma, líquido e fluido seminal - estabilidades .....	146
Tabela 40 - GS-331007 em plasma, líquido e fluido seminal - estabilidades.....	146
Tabela 41 - Sofosbuvir, GS-331007 e PI - estabilidade curta duração.....	148
Tabela 42 - Sofosbuvir, GS-331007 e PI - estabilidade armazenamento.....	148
Tabela 43 - Sofosbuvir, GS-331007 e PI - estabilidade curta duração.....	149
Tabela 44 - Sofosbuvir, GS-331007 e PI - estabilidade armazenamento.....	149
Tabela 45 - Sofosbuvir, GS-331007 e PI - estabilidade curta duração.....	150
Tabela 46 - Sofosbuvir, GS-331007 e PI - estabilidade armazenamento.....	150
Tabela 47 - Sofosbuvir em plasma e LCR - concentração e razão de penetração .	153
Tabela 48 - GS-331007 em plasma e LCR - concentração e razão de penetração	156
Tabela 49 - Sofosbuvir em plasma e FS - concentração e razão de penetração ....	160
Tabela 50 - GS-331007 em plasma e FS - concentração e razão de penetração...	163

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica
API	Ionização à Pressão Atmosférica
APPI	Fotoionização à Pressão Atmosférica
$ASC_{0-\infty}$	Area sob a curva do tempo zero ao infinito
BCRP	Proteína de Resistência ao Câncer de Mama
BHE	Barreira hematoencefálica
BHT	Barreira hematotesticular
BPL	Boas Práticas de laboratório
CAD	Dissociação induzida por colisão
CAD gas	Gás de dissociação
CAF	Cafeína
Carboxilesterase 1	CES1
CatA	Catepsina A
CD	Congelamento e descongelamento
CE	Energia de colisão
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
$C_{max}$	Concentração plasmática máxima
CMT	Cimetidina
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade alto
CQA-FD	Controle de qualidade alto fortificado depois
CQB	Controle de qualidade baixo
CQB-FD	Controle de qualidade baixo fortificado depois
CQD	Controle de qualidade de diluição
CHIKV	Vírus da Chikungunya
CQM	Controle de qualidade média concentração
CUR gás	Gás de cortina CUR (gás de contracorrente)
CV	Coefficiente de variação
CXP	Potencial de saída da célula de colisão

CYP	Enzimas do Citocromo P-450
CZS	Síndrome de Zika Congênita
DP	Potencial de declusterização (desagrupamento)
Dwell time	Tempo de aquisição de sinal
DZP	Diazepam
EFS	Extração em fase sólida
ELL	Extração líquido-líquido
EP	Potencial de entrada
EPR	Erro padrão relativo (desvio em relação à concentração nominal)
ER%	Erro relativo percentual dos resíduos
ESI	Ionização por Eletrospray
FD	Fortificado depois da extração
FDA	Agência Reguladora de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos
FIA	Espectrometria de massas por injeção em fluxo
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FMA	Fase móvel aquosa
FMN	Fator de matriz normalizado
FMO	Fase móvel orgânica
FS	Fluido seminal
GS1 gás	Gás de nebulização
GS2 gás	Gás de aquecimento/secagem
GS-331007	Metabólito inativo do sofosbuvir
GS-461203	Metabólito ativo do sofosbuvir
HCV	Vírus da Hepatite C
HINT1	Proteína ligante de nucleotídeo tríade de histidina 1
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	Conselho Internacional de Harmonização
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
IS	Voltagem do ionspray

JEV	Vírus da Encefalite Japonesa
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial
LCR	Líquor ou líquido cefalorraquidiano
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
NC	Não coletada
NDPK	Nucleosídeo difosfato quinase
NS1	Proteína não Estrutural do ZIKV
NS2A	Proteína não Estrutural do ZIKV
NS2B	Proteína não Estrutural do ZIKV
NS3	Proteína não Estrutural do ZIKV
NS4A	Proteína não Estrutural do ZIKV
NS4B	Proteína não Estrutural do ZIKV
NS5	Proteína não Estrutural do ZIKV
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
P-gp	Glicoproteína-P
PI	Padrão interno
PP	Precipitação de Proteínas
prM	Proteína Estrutural do ZIKV
r	Coefficiente de correlação
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
RPM	Rotações por minuto
SARS	Síndrome respiratória aguda grave
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SFB	Sofosbuvir
SGB	Síndrome de Guillain–Barré
SME	Solução mestre/solução estoque
SNC	Sistema Nervoso Central

SQR	Substância química de referência
SRM	Monitoramento de reação selecionada
SUS	Sistema Único de Saúde
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida de eliminação
TBME	Éter etil-terc-butílico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEM	Temperatura da fonte do espectrômetro de massas
$t_{max}$	Tempo em que se observa a concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ )
TOF	Espectrometria de massas por tempo de voo
$t_r$	Tempo de retenção cromatográfico
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UMP-CMPK	Uridina monofosfato/citidina monofosfato quinase
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Detector de Ultravioleta/visível
WNV	Vírus do Nilo Ocidental
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZDV	Zidovudina
ZIKV	Vírus da Zika

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1</b>	<b>O vírus da Zika</b> .....	<b>24</b>
1.1.1	O agente etiológico da Zika .....	24
1.1.2	Epidemiologia da Zika .....	25
1.1.3	Diagnóstico laboratorial da Zika .....	27
1.1.4	Tratamento da Zika .....	27
<b>1.2</b>	<b>Estudo farmacocinético</b> .....	<b>28</b>
1.2.1	Farmacocinética do sofosbuvir .....	29
1.2.1.1	<i>Penetração nos sistemas nervoso central e reprodutivo masculino</i> .....	31
<b>1.3</b>	<b>O reposicionamento de fármacos no enfrentamento da Zika</b> .....	<b>32</b>
<b>1.4</b>	<b>LC-MS/MS na análise de sofosbuvir e GS-331007</b> .....	<b>33</b>
1.4.1	Cromatografia líquida de alta eficiência .....	33
1.4.2	Espectrometria de massas .....	35
1.4.2.1	<i>As fontes de ionização</i> .....	36
1.4.2.2	<i>Analisadores de massas</i> .....	38
1.4.2.2.1	<u>Triplo quadrupolo e os tipos de escaneamento</u> .....	39
1.4.3	Desenvolvimento de metodologia .....	42
1.4.3.1	<i>Investigação das condições analíticas da espectrometria de massas</i> .....	42
1.4.3.2	<i>Investigação das condições analíticas da cromatografia líquida</i> .....	42
1.4.3.3	<i>Investigação do método de extração das amostras</i> .....	43
1.4.3.3.1	<u>A matriz plasma sanguíneo</u> .....	44
1.4.3.3.2	<u>A matriz líquor</u> .....	44
1.4.3.3.3	<u>A matriz fluido seminal</u> .....	45
1.4.3.4	<i>Delineamento da curva de calibração em matriz</i> .....	45
1.4.3.5	<i>Avaliação de controles de qualidade em matriz</i> .....	46
1.4.3.6	<i>Investigação do padrão interno</i> .....	46
1.4.3.7	<i>Avaliação do efeito de matriz e seletividade</i> .....	46
1.4.3.8	<i>Avaliação do arraste</i> .....	47
1.4.3.9	<i>Avaliação de substâncias potencialmente interferentes</i> .....	47
<b>1.5</b>	<b>Validação</b> .....	<b>47</b>
<b>1.6</b>	<b>Justificativa</b> .....	<b>49</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>50</b>

<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>50</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>50</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiais .....</b>	<b>51</b>
3.1.1	Equipamentos, instrumentos e consumíveis de uso geral.....	51
3.1.2	Componentes para análise e identificação .....	52
3.1.3	Substâncias químicas de referência, medicamento e reagentes.....	52
<b>3.2</b>	<b>Matriz biológica branca.....</b>	<b>53</b>
<b>3.3</b>	<b>Desenvolvimento de metodologias bioanalíticas .....</b>	<b>54</b>
3.3.1	Solução dos analitos sofosbuvir e GS-331007 .....	55
3.3.2	Solução dos candidatos a padrão interno .....	56
3.3.3	Soluções das substâncias potencialmente interferentes .....	57
3.3.4	Investigação das condições analíticas da espectrometria de massas.....	57
3.3.5	Investigação das condições cromatográficas .....	59
3.3.6	Investigação do método de extração das amostras .....	60
3.3.7	Avaliação preliminar de parâmetros da validação .....	62
3.3.8	Estabelecimento do limite inferior de quantificação (LIQ).....	62
3.3.9	Delineamento da curva de calibração em matriz.....	62
3.3.10	Delineamento dos níveis de concentração dos controles de qualidade .....	64
<b>3.4</b>	<b>Validação de metodologias bioanalíticas.....</b>	<b>64</b>
3.4.1	Seletividade .....	65
3.4.1.1	<i>Seletividade na presença de potenciais interferentes .....</i>	<i>66</i>
3.4.2	Efeito matriz.....	66
3.4.2.1	<i>Efeito de matriz com potenciais interferentes .....</i>	<i>68</i>
3.4.3	Contaminação cruzada ou arraste.....	68
3.4.4	Linearidade.....	69
3.4.5	Precisão e exatidão .....	70
3.4.6	Diluição.....	70
3.4.7	Estabilidade dos analitos em matriz biológica .....	70
3.4.7.1	<i>Estabilidade de curta duração .....</i>	<i>71</i>
3.4.7.2	<i>Estabilidade pós-extração (pós-processamento).....</i>	<i>71</i>
3.4.7.3	<i>Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.....</i>	<i>71</i>
3.4.7.4	<i>Estabilidade de longa duração .....</i>	<i>71</i>
3.4.8	Estabilidade dos analitos e padrões internos em solução .....	72

<b>3.5</b>	<b>Ensaio clínico piloto com foco em Zika</b> .....	<b>72</b>
3.5.1	Primeira etapa - Penetração no SNC .....	74
3.5.2	Segunda etapa - Penetração no sistema reprodutivo masculino.....	74
3.5.3	Quantificação das amostras clínicas .....	75
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>4.1</b>	<b>Desenvolvimento de metodologias bioanalíticas</b> .....	<b>76</b>
4.1.1	Soluções SQR's dos analitos (sofosbuvir e GS-331007) .....	81
4.1.2	Soluções dos candidatos a padrão interno.....	81
4.1.3	Soluções dos potenciais interferentes (nicotina e cafeína).....	82
4.1.4	Parâmetros Espectrômetro de massas .....	83
4.1.4.1	<i>Infusão direta</i> .....	83
4.1.4.2	<i>Injeção em fluxo (FIA)</i> .....	90
4.1.5	Condições cromatográficas .....	91
4.1.5.1	<i>Condições cromatográficas – matriz plasma</i> .....	92
4.1.5.2	<i>Condições cromatográficas – matriz líquido e fluido seminal</i> .....	97
4.1.6	Extração das amostras.....	100
4.1.6.1	<i>Extração das amostras – matriz plasma</i> .....	100
4.1.6.2	<i>Extração das amostras – matriz líquido e fluido seminal</i> .....	105
4.1.7	Investigação preliminar de parâmetros da validação.....	109
4.1.8	Estabelecimento do limite inferior de quantificação (LIQ).....	112
4.1.9	Delineamento da curva de calibração .....	116
4.1.10	Delineamento dos níveis de concentração dos controles de qualidade ...	118
<b>4.2</b>	<b>Validação de metodologias bioanalíticas</b> .....	<b>119</b>
4.2.1	Seletividade .....	119
4.2.1.1	<i>Seletividade em plasma</i> .....	120
4.2.1.1.1	<u>Seletividade em plasma com potenciais interferentes</u> .....	123
4.2.1.2	<i>Seletividade em líquido</i> .....	124
4.2.1.2.1	<u>Seletividade em líquido com potenciais interferentes</u> .....	127
4.2.1.3	<i>Seletividade em fluido seminal</i> .....	128
4.2.1.3.1	<u>Seletividade em fluido seminal com potenciais interferentes</u> .....	131
4.2.2	Efeito matriz.....	132
4.2.2.1	<i>Efeito matriz em plasma</i> .....	132
4.2.2.1.1	<u>Efeito matriz em plasma com potenciais interferentes</u> .....	134
4.2.2.2	<i>Efeito matriz em líquido</i> .....	135

4.2.2.2.1	<u>Efeito matriz em líquido com potenciais interferentes</u> .....	136
4.2.2.3	<i>Efeito matriz em fluido seminal</i> .....	136
4.2.2.3.1	<u>Efeito matriz em fluido seminal com potenciais interferentes</u> .....	137
4.2.3	Contaminação cruzada ou arraste.....	138
4.2.4	Linearidade.....	140
4.2.5	Precisão, exatidão e processo de diluição .....	141
4.2.6	Estabilidade dos analitos em matriz biológica .....	145
4.2.7	Estabilidade dos analitos e padrões internos nas soluções SQR.....	147
<b>4.3</b>	<b>Ensaio clínico piloto e quantificação das amostras</b> .....	<b>151</b>
4.3.1	Primeira Etapa - penetração no sistema nervoso central .....	152
4.3.1.1	<i>Penetração de Sofosbuvir no sistema nervoso central</i> .....	152
4.3.1.2	<i>Penetração de GS-31007 no sistema nervoso central</i> .....	155
4.3.2	Segunda etapa - penetração no sistema reprodutivo masculino.....	158
4.3.2.1	<i>Penetração de sofosbuvir no sistema reprodutivo masculino</i> .....	159
4.3.2.2	<i>Penetração de GS-331007 no sistema reprodutivo masculino</i> .....	162
4.3.3	Compilação dos resultados obtidos.....	165
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>166</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>168</b>
	<b>ANEXO A —TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)</b> ..	<b>176</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Hepatite C crônica é uma doença causada pelo vírus da hepatite C (HCV), que se caracteriza pela inflamação persistente do fígado. Ela está associada às condições potencialmente fatais como cirrose e carcinoma hepático e atinge, segundo relatório recente da Organização Mundial da Saúde, 58 milhões de pessoas pelo mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021).

Por muitos anos, apesar do baixo percentual de cura (em torno de 50 %) e alta incidência de eventos adversos, o tratamento padrão consistiu na administração de interferon alfa e ribavirina. Recentemente, novos fármacos, os antivirais de ação direta representados pelo sofosbuvir, ledipasvir e daclatasvir, foram incluídos na prática clínica. Eles possuem vantagens tais como maior especificidade, facilidade posológica (administração oral) e, principalmente, maior índice de cura. Além disso, a duração do tratamento é menor assim como a incidência de efeitos adversos (ECHEVERRIA et al., 2015; WEBSTER; KLENERMAN; DUSHEIKO, 2016).

O sofosbuvir, em especial, além da atividade contra o HCV, mostrou resultados positivos contra diversos patógenos, como os causadores de Zika, Chikungunya, Dengue, Febre amarela e COVID-19 (SOUZA et al., 2017a, 2017b, 2019a, 2019b, 2021; XU et al., 2017).

Particularmente em relação à Zika, em 2017, um grupo de pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) demonstrou a ação do sofosbuvir na replicação do vírus da Zika em diferentes sistemas celulares (SOUZA et al., 2017a). Ainda no referido ano, outro estudo revelou que o fármaco promove redução da mortalidade e sequelas associadas à infecção por ZIKV em camundongos (SOUZA et al., 2017b). Em 2020, uma outra pesquisa com macacas grávidas infectadas com Zika obteve resultados positivos com o sofosbuvir, pois ocorreu uma redução da transmissão vertical e dos efeitos deletérios da Zika Congênita (GARDINALI et al., 2020).

O Zika vírus, embora muitas vezes provoque um quadro clínico leve, ainda é uma ameaça à saúde pública global, visto que ainda não há vacina nem tratamento farmacológico disponíveis. Além disso, pode causar comprometimentos neurológicos graves em adultos, tal como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), que pode levar à paralisia total dos membros e óbito. Em caso de infecção durante a gestação, pode

ainda causar o quadro grave de Zika congênita, conhecido como microcefalia (PERGOLIZZI et al., 2021; GUO et al., 2022).

A picada do mosquito *Aedes* é a principal forma de transmissão. Entretanto, a Zika também é considerada uma Infecção Sexualmente Transmissível (IST), pois pode ser transmitida durante o ato sexual (MOREIRA et al., 2017). A propósito, um grupo de pesquisadores calculou a probabilidade do contágio sexual por meio da investigação de viajantes. Foi constatado que os homens são os principais agentes da transmissão sexual de Zika (MAJOR et al., 2021).

Vale ressaltar que o vírus apresenta grande viabilidade em líquido seminal e pode ser isolado desse fluido até 69 dias após a infecção (BORGES et al., 2019). Diante disso, as mulheres grávidas requerem cuidados adicionais, pois podem ser infectadas pelo parceiro durante o ato sexual (MAJOR et al., 2021). Nesse sentido, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos e o Ministério da Saúde do Brasil reforçam o uso do preservativo durante toda a gravidez, sobretudo em caso de viagem para local com alta transmissão ou exposição ao vetor (MEAD; HILLS; BROOKS, 2018; DUARTE et al., 2021).

Considerando os resultados promissores revelados pelo sofosbuvir e a necessidade urgente de estabelecer um tratamento específico para a Zika, esta pesquisa visou desenvolver e validar metodologias bioanalíticas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) para apurar com precisão e exatidão as concentrações de sofosbuvir e de seu principal metabólito (GS-331007) em plasma, líquido e fluido seminal humanos. A validação completa das metodologias foi realizada conforme guia para validação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012. Posteriormente, as metodologias foram aplicadas na análise de amostras reais dos participantes de um ensaio clínico piloto pioneiro com foco em Zika.

## **1.1 O vírus da Zika**

### **1.1.1 O agente etiológico da Zika**

O ZIKV é um vírus de RNA do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. Sua família engloba importantes patógenos, tais como o vírus da Hepatite C (HCV),

dengue (DENV), encefalite japonesa (JEV) e o vírus do Nilo Ocidental (WNV) (HOU et al., 2017). Ele foi isolado pela primeira vez em macacos em 1947. Em humanos, foi isolado no ano de 1952, na Uganda e Tanzânia.

É um vírus de RNA de fita simples formado por 10794 nucleotídeos e possui o diâmetro de aproximadamente 50 nm. Seu material genético codifica uma poliproteína de 3423 aminoácidos, a qual, após clivagem por proteases virais e do hospedeiro, gera proteínas estruturais (C, proteína do capsídeo; prM, proteína precursora de membrana; E, proteína E) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (PLOURDE; BLOCH, 2016; LI et al., 2017; HOFFMEYER, 2000; MASMEJAN et al., 2020). As proteínas estruturais são necessárias para a formação da partícula viral, enquanto as não estruturais são essenciais para a replicação (SONG et al., 2017).

O vírus Zika entra em contato com a célula hospedeira através de ligação não específica à superfície celular. Em seguida, ocorre a internalização viral, que se dá por meio de interações específicas, permitindo a entrada do material genético no citoplasma da célula hospedeira.

Posteriormente, inicia-se a multiplicação viral no interior de complexos de replicação, que são compostos por: material genético viral, proteínas e fatores da célula hospedeira.

A montagem de partículas virais imaturas é iniciada pela ligação do complexo RNA viral-proteína C ao retículo endoplasmático, que é o local onde ocorre o envelopamento viral pela bicamada lipídica, que possui a proteína viral prM e a proteína viral E. Uma vez formada, a partícula viral sofre um processo de maturação ao longo do caminho de secreção, passando por modificações que inclui a clivagem da proteína viral prM para produzir a proteína M madura. Ao final, os vírions maduros ou parcialmente maduros estão prontos para serem excitados da célula hospedeira (SONG et al., 2017).

### 1.1.2 Epidemiologia da Zika

A principal forma de transmissão de Zika é a picada do mosquito do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti*, um mosquito altamente antropofílico, favorecendo a transmissão nos ambientes urbanos. Além disso, o contágio também pode ocorrer através do contato com diferentes materiais biológicos: sangue, urina,

saliva, leite e fluido seminal. Este último, por sua vez, possui um papel relevante na transmissão sexual de Zika (OZKURT; TANRIVERDI, 2017; SONG et al., 2017; KURSCHEIDT et al., 2019).

O primeiro grande surto de Zika foi relatado na Oceania, mais precisamente na Micronésia em 2007. Posteriormente, também foram observados novos surtos em 2013 e 2014 na Polinésia e Nova Caledônia, respectivamente. Devido ao mundo globalizado, o vírus da Zika vem se espalhando rapidamente. Pressupõe-se que ele tenha entrado no Brasil durante a Copa do Mundo de 2014 (PERGOLIZZI et al., 2021).

No Brasil, o vírus se espalhou e atingiu 14 estados, até que em 2015 foi evidenciada a associação entre a infecção e os casos de microcefalia no Nordeste, além do aumento de incidência de problemas neurológicos em adultos, principalmente a SGB (OZKURT; TANRIVERDI, 2017; SONG et al., 2017). Em virtude do rápido avanço do número de casos, a OMS considerou, no ano de 2016, a infecção por ZIKV uma emergência de saúde pública de preocupação internacional (SONG et al., 2017).

O período de incubação da doença é de 3 a 12 dias e a infecção é branda e autolimitada. A estimativa é que 80 % dos casos são assintomáticos e os sintomas mais comuns são febre baixa, coceira e manchas vermelhas na pele (*rash* cutâneo), vermelhidão nos olhos, dor de cabeça, dor de garganta, dor ocular, dor nas articulações, dor muscular, edema nas extremidades, descamação nas mãos e pés e linfadenopatias. A maioria dos sintomas podem persistir por uma semana, enquanto as dores nas articulações podem persistir por um tempo maior, de aproximadamente duas semanas. Trata-se de uma doença branda, com baixo índice de mortalidade, não sendo necessária a internação do indivíduo acometido.

Porém, podem ocorrer diversas complicações neurológicas em adultos, algumas de importância médica como meningite e SGB, que é um grande problema associado à infecção. Além disso, outras relevantes desordens neurológicas também foram relacionadas à doença: encefalomielite, mielite aguda e mielite transversa (OZKURT; TANRIVERDI, 2017).

Em caso de infecção durante a gestação, pode ocorrer o quadro grave conhecido como Síndrome da Zika Congênita. Ele é caracterizado pela ocorrência de microcefalia e outros problemas neurológicos, tais como calcificação cerebral, ventriculomegalia e hipoplasia cerebelar. Além disso, também podem ocorrer

anormalidades cardíacas, patologias oculares e atrofia macular (OZKURT; TANRIVERDI, 2017; BENAZZATO; RUSSO; BELTRÃO-BRAGA, 2022).

### 1.1.3 Diagnóstico laboratorial da Zika

O exame clínico não é suficiente para a confirmação do diagnóstico da infecção por Zika uma vez que há sobreposição de sintomas com outras doenças como a Dengue e Chikungunya, o que torna necessária a realização de um exame laboratorial para confirmação.

A técnica da Reação em cadeia da polimerase (PCR), em amostras de sangue ou outros fluidos, como urina ou saliva, é a metodologia adotada para o diagnóstico confirmatório, sendo que a urina é a matriz mais adequada conforme revelado por uma pesquisa de 2016, que foi conduzida pelo Departamento de Saúde Pública da Flórida (PERGOLIZZI et al., 2021).

O teste PCR deve ser adotado para diagnóstico de Zika na fase aguda da doença (até 7 dias após o início dos sintomas). Nessa fase, a sorologia não é indicada, pois as imunoglobulinas podem ser indetectáveis, gerando resultados falso negativos. Outra limitação das técnicas sorológicas é a possibilidade de ocorrência de reação cruzada com outros Flavivirus, sobretudo o vírus da Dengue, resultando em resultados falsos positivos. (PLOURDE; BLOCH, 2016).

### 1.1.4 Tratamento da Zika

Na maioria dos casos, conforme mencionado anteriormente, a Zika está associada a um quadro brando e sem a manifestação de sinais clínicos severos. Como ainda não existe um antiviral para tratamento, a recomendação é que os sintomas sejam tratados, priorizando o descanso e a ingestão de líquidos. Também pode ser necessária a administração de analgésicos e antipiréticos, exceto aspirina e anti-inflamatórios não esteroidais, pois podem provocar hemorragia caso seja dengue (PLOURDE; BLOCH, 2016).

Além disso, as medidas profiláticas de combate ao mosquito transmissor, como o uso de repelentes e telas para mosquitos também devem ser adotadas. Tais medidas devem ser associadas à eliminação dos locais de desenvolvimento de ovos

do mosquito (vasos de planta, pneus etc.). Também é importante destacar a necessidade de uso do preservativo durante as relações sexuais em caso de viagem para regiões com alta transmissão de Zika, evitando, dessa forma, a transmissão sexual do vírus (PLOURDE; BLOCH, 2016).

Apesar de ser uma doença branda, as complicações associadas geram grande preocupação e, por esse motivo, é imprescindível e urgente a descoberta de antivirais e vacinas, os quais ainda não estão disponíveis (PERGOLIZZI et al., 2021; BENAZZATO; RUSSO; BELTRÃO-BRAGA, 2022; GUO et al., 2022).

## **1.2 Estudo farmacocinético**

Estudo farmacocinético é um estudo controlado que envolve a medida da concentração de um fármaco e/ou seu metabólito em um fluido biológico em períodos programados (CROTTI et al., 2015).

É um estudo de grande importância, pois determina como o corpo lida com o fármaco, compreendendo as investigações relacionadas à absorção, distribuição, biotransformação e eliminação. Esses processos sofrem influência de características intrínsecas dos indivíduos, tais como a genética, a massa corporal e a idade, mas também são influenciados por características relacionadas ao fármaco, como a dose e a formulação. Além disso, fatores como a via e frequência de administração (dose simples ou múltipla) também resultam em modificações nos parâmetros farmacocinéticos (CROTTI et al., 2015).

A absorção é o processo que permite a entrada do fármaco na corrente sanguínea (WHALEN et al., 2016). Considera-se que a concentração do fármaco circulante na corrente sanguínea é responsável por sua atividade farmacológica, pois é a partir da corrente sanguínea que o fármaco é distribuído para outros compartimentos corporais (CROTTI et al., 2015).

A distribuição, por sua vez, é o processo pelo qual o fármaco deixa o leito vascular e alcança o líquido extracelular e as células dos tecidos, atingindo os sítios de ação. É um processo que depende de diversos fatores, como débito cardíaco, fluxo sanguíneo local, permeabilidade capilar, volume tecidual, grau de ligação do fármaco às proteínas plasmáticas e lipofilicidade. Trata-se de, portanto, de uma etapa

multifatorial, podendo gerar resultados com ampla variabilidade (WHALEN et al., 2016).

A etapa seguinte à distribuição é a biotransformação, que consiste na transformação metabólica do fármaco em uma substância de maior polaridade, favorecendo sua eliminação. A propósito, o metabólito GS-331007 do sofosbuvir, que é mais polar, é mais facilmente eliminado do organismo. A biotransformação também sofre influência de múltiplos fatores, uma vez que envolve a atuação de diversas enzimas, inclusive o Sistema P450 (WHALEN et al., 2016). Vale mencionar que não há participação das enzimas do Citocromo P-450 na biotransformação do sofosbuvir (KIRBY et al., 2015).

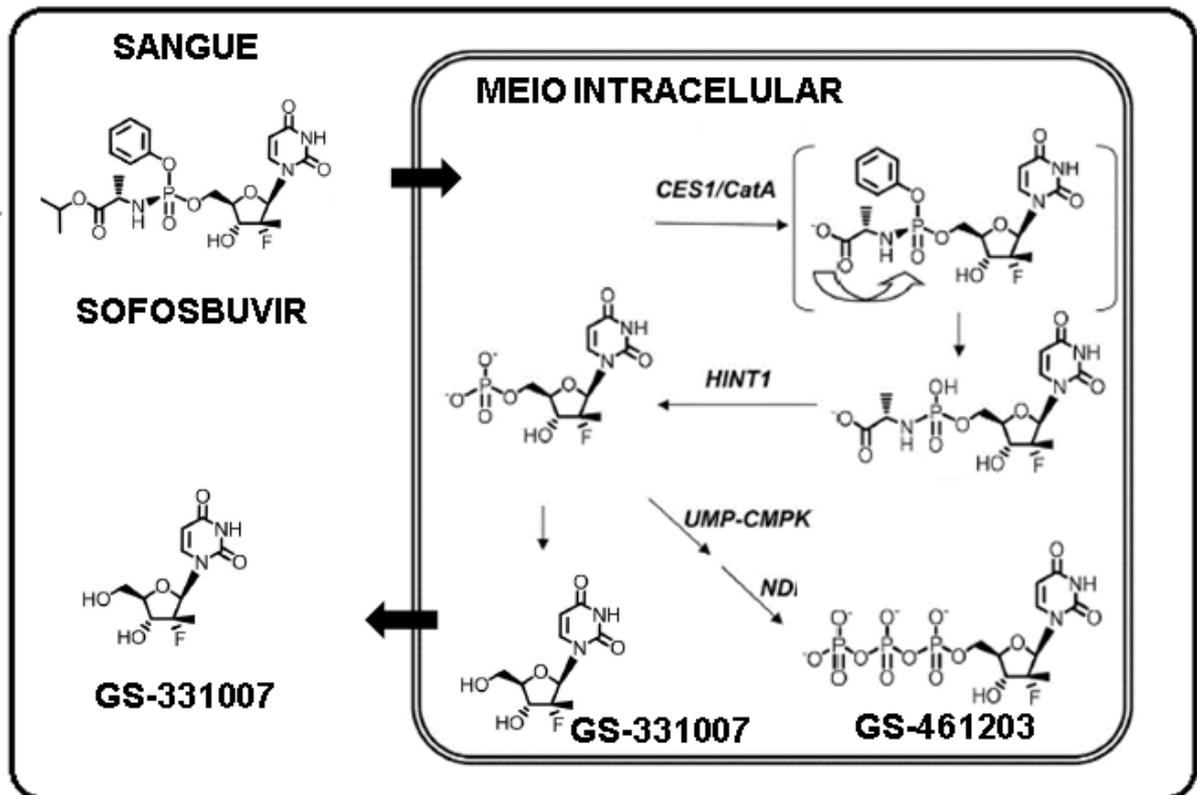
Por fim, ocorre a eliminação, que é a última etapa do fármaco e seus metabólitos no organismo. Ela ocorre principalmente por: biotransformação hepática, eliminação biliar e renal. No entanto, também são observadas outras vias, mesmo que em menor extensão: eliminação intestinal, pulmonar, por fluidos corporais (leite, suor, saliva e lágrimas), cabelos e pele (WHALEN et al., 2016).

### 1.2.1 Farmacocinética do sofosbuvir

O sofosbuvir é um pró-fármaco aprovado para tratamento da Hepatite C, sendo o esquema padrão constituído pela administração, por via oral, de um comprimido de 400 mg uma vez ao dia por 12 a 24 semanas. Sua ação antiviral requer ativação intracelular, que consiste na formação da molécula trifosforilada (GS-461203). Essa conversão ocorre rapidamente e é decorrente da ação de enzimas, fazendo com que o sofosbuvir apresente um reduzido tempo de meia-vida plasmático ( $t_{1/2}$ ), conforme dados da tabela 1. Após a ativação, a forma ativa liga-se ao RNA viral em formação e inibe a atividade da polimerase do HCV, interrompendo a replicação viral (KIRBY et al., 2015).

A figura 1 apresenta a cadeia de reações supramencionada. Ela contempla a ação das seguintes enzimas: catepsina A (CatA), Carboxilesterase 1 (CES1), proteína ligante de nucleotídeo tríade de histidina 1 (HINT1), uridina monofosfato/citidina monofosfato quinase (UMP-CMPK) e nucleosídeo difosfato quinase (NDPK). Ressalta-se que não há participação das enzimas do Citocromo P-450 (KIRBY et al., 2015).

Figura 1 - Biotransformação do sofosbuvir



Fonte: Adaptado de (WANG et al., 2020)

De acordo com estudos em animais, o análogo ativo (GS-461203) apresenta  $t_{1/2}$  hepático de aproximadamente 18 h. No entanto, essa espécie é encontrada apenas no meio intracelular e, por esse motivo, não foi quantificada no presente estudo (KIRBY et al., 2015).

Em contrapartida, a espécie GS-331007, originada da defosforilação de GS-461203, atinge o leito vascular até chegar nos rins, que promovem sua eliminação pela urina. Além disso, a forma GS-331007 é o principal metabólito circulante do sofosbuvir, sendo, portanto, um importante elemento nas investigações disponíveis na literatura (KIRBY et al., 2015).

Ensaios *in vitro* revelaram que a forma defosforilada (GS-331007) não apresenta atividade contra o vírus HCV. Seu longo tempo de meia-vida (24 - 27 h) pode ser explicado pelo fato de que sua formação se dá a partir da forma trifosforilada (GS-461203), que apresenta um longo tempo de permanência na célula hepática (KIRBY et al., 2015).

A tabela 1 apresenta parâmetros farmacocinéticos de publicações da literatura. Os dados mostrados foram obtidos por meio de análise não compartimental após a administração de um comprimido de 400 mg de sofosbuvir da formulação de referência (Sovaldi®).

Tabela 1 - Dados farmacocinéticos do sofosbuvir e GS-331007 obtidos por análise não compartimental (dose única de 400 mg de sofosbuvir (Sovaldi®) a humanos saudáveis)

Parâmetro	KIRBY et al., 2015 (n = 59)		REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015 (n = 24)		LI et al., 2018 (n = 14)	
	Sofosbuvir	GS-331007	Sofosbuvir	GS-331007	Sofosbuvir	GS-331007
$C_{max}$ (ng/mL)	622,0 (348,9)	1110,0 (310,8)	1860,1 (739,1)	1455,5 (444,1)	1001,7 (465,8)	1096,9 (261,1)
$ASC_{0-\infty}$ hr* (ng/mL)	629,0 (282,4)	11100,0 (2.508,6)	2078,8 (898,0)	21194,3 (8.290,9)	861,0 (323,7)	10191,1 (1844,6)
$t_{max}$ (h)	0,5 - 2,0	2,0 - 4,0	0,75	4,0	0,5 - 1,0	1,5 - 3,0
$t_{1/2}$ (h)	0,4	27,0	0,54 (0,26)	24,68 (8,16)	0,38	24,96

Legenda:  $C_{max}$  Concentração plasmática máxima;  $ASC_{0-\infty}$  Área sob a curva do tempo zero ao infinito;  $t_{max}$  Tempo em que se observa a concentração plasmática máxima;  $t_{1/2}$  Tempo de meia-vida de eliminação

Fonte: (Do autor, 2022).

### 1.2.1.1 Penetração nos sistemas nervoso central e reprodutivo masculino

O corpo humano possui diversas estruturas que limitam a entrada de compostos exógenos. Então, os fármacos precisam atravessá-las para que possam atingir níveis eficazes no sítio de ação. Pode-se dizer que quanto menor a penetração de um agente em determinado compartimento corporal, maior a probabilidade de falha terapêutica (GOODMAN et al., 2018).

A barreira hematoencefálica (BHE) é um exemplo desse tipo de estrutura. Ela atua limitando a entrada de substâncias no sistema nervoso central, pois age como um filtro entre o sangue circulante e o tecido nervoso. Assim, cria um obstáculo, limitando o acesso ao sistema nervoso central e ao líquido. Em geral, quanto mais

lipofílica for uma molécula, maior sua capacidade de permear a BHE. Além disso, existem alguns transportadores específicos, como a Glicoproteína-P (P-gp), que atuam bloqueando o trânsito de xenobióticos entre o sangue circulante e o líquido (GOODMAN et al., 2018).

A barreira hematotesticular (BHT) constitui outra importante estrutura que protege as células germinativas, o que é essencial para a espermatogênese. Assim, a BHT funciona como um limitador da entrada de substâncias no sistema reprodutivo Masculino (MRUK; CHENG, 2015; MENG et al., 2022)

É conhecido, entretanto, que a distribuição de fármacos antirretrovirais no trato genital masculino depende das características da substância e apresenta alta variabilidade interindividual. A partir de estudos realizados com pacientes infectados com o vírus HIV, foi observado que a concentração de tenofovir no fluido seminal é maior do que a concentração plasmática, o que pode ser traduzido como alta penetração no sistema reprodutivo masculino (VALADE et al., 2017).

Diante do exposto, considerando a gravidade dos problemas neurológicos associados à Zika e a possibilidade de transmissão sexual, a quantificação de sofosbuvir e seu metabólito no sistema nervoso central e reprodutivo masculino é fundamental para elucidar a capacidade do fármaco em alcançar esses sistemas acometidos pelo vírus.

### **1.3 O reposicionamento de fármacos no enfrentamento da Zika**

As duas últimas décadas, sem mencionar a atual pandemia de COVID-19, foram marcadas pela emergência, sem precedentes, de inúmeras epidemias de vírus zoonóticos, ou seja, transmitidos entre animais e seres humanos. A título de exemplo, vale lembrar as epidemias de Síndrome Respiratória aguda grave (SARS), Síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS), Ebola, Nipah, Chikungunya, febre amarela e Zika (XIE; SHI, 2019).

Considerando que a emergência desses patógenos é imprevisível, torna-se imperativo o desenvolvimento de formas rápidas e eficazes de conter sua disseminação. Nessa perspectiva, o reposicionamento de fármacos, isto é, a atribuição de uma nova indicação para um fármaco cujo uso já é aprovado para outra

indicação, é uma estratégia de maior rapidez e custo-efetividade, sendo, portanto, de extrema importância no combate a determinado surto epidêmico (XIE; SHI, 2019).

O sofosbuvir, por exemplo, é um fármaco cujo uso no tratamento da Hepatite C já se encontra bem estabelecido. Além disso, de acordo com a literatura, mostrou grande potencial no combate à Zika, reforçando a necessidade de estudos adicionais visando seu reposicionamento (ZOU; SHI, 2019; BENAZZATO; RUSSO; BELTRÃO-BRAGA, 2022).

#### **1.4 LC-MS/MS na análise de sofosbuvir e GS-331007**

A espectrometria de massas é uma técnica analítica amplamente utilizada na pesquisa biomédica, principalmente após o desenvolvimento das formas brandas de ionização, como a ionização por eletrospray (ESI). Ela apresenta alta seletividade, sensibilidade, produtividade e simplifica as análises simultâneas de múltiplas substâncias (CUYCKENS, 2018; CHAE et al., 2019).

No que diz respeito às análises farmacocinéticas, a análise por LC-MS/MS é capaz de detectar os fármacos e seus metabólitos em baixas concentrações mesmo com o emprego de pequenos volumes de amostra. Além disso, devido à alta seletividade, propicia a identificação unívoca da substância de interesse em matrizes de alta complexidade como os fluidos biológicos. Diante dessas vantagens, a espectrometria de massas sequencial com ionização branda é o padrão ouro em estudos quantitativos em matrizes complexas (CROTTI et al., 2015; CUYCKENS, 2018 SELCUK et al., 2021).

##### **1.4.1 Cromatografia Líquida de alta eficiência**

A cromatografia líquida é uma técnica de separação de grande relevância e foi responsável pela ampliação do conhecimento no campo das ciências ao longo do século XX, levando diversos autores a denominar essa época de “o século da cromatografia” (COLLINS, 2009).

O pesquisador russo Michael Semenovich Tswett foi responsável pela incorporação das palavras cromatografia e cromatograma na ciência. Ele realizou diversos experimentos no ano de 1906 que permitiram a separação de pigmentos

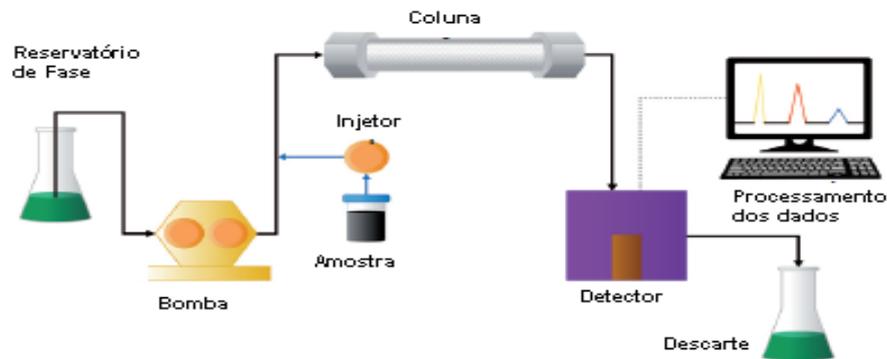
vegetais em solução líquida pela passagem em um sólido (fase estacionária). Tal separação, que ele denominou de cromatografia, gerou bandas de cores distintas ou cromatogramas. À luz do conhecimento atual, Tsweett realizou o processo de cromatografia líquido-sólido, isto é, cromatografia de adsorção e influenciou outros estudiosos a conduzir novas investigações (COLLINS, 2009).

No decorrer dos anos, com o desenvolvimento de novas colunas e tecnologias, foi possível um aumento de performance nas separações cromatográficas, levando ao que é conhecido hoje como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), que são cromatografias líquido-líquido, isto é, cromatografia de partição (KITAGAWA, 2019). Tais técnicas são utilizadas nos campos da bioquímica, pesquisa clínica, forense, monitoramento ambiental e farmacêutico e vêm contribuindo para expressivo desenvolvimento da ciência (FANALI *et al.*, 2013; BLUM, 2014).

Um típico sistema cromatográfico é formado pelos seguintes componentes: reservatório para fase móvel, bomba, injetor, coluna, detector, recipiente para descarte e uma estação para o processamento dos dados (LANÇAS, 2009; BLUM, 2014). A cromatografia líquido-líquido em fase reversa (RP-HPLC), cuja fase estacionária é apolar, é o modo mais utilizado devido à grande variedade de aplicações (CASS; CASSIANO, 2015). Ela compreende mais de 90 % de todas as análises cromatográficas e dispõe de mais de 600 tipos de colunas (LIU *et al.*, 2019).

Basicamente, seu funcionamento consiste no bombeamento da fase móvel, que conduz a amostra em direção ao detector. Nesse caminho, a amostra passa pela coluna, onde ocorre a separação das substâncias antes de chegar no detector. As diferentes substâncias atingem o detector em tempos distintos (tempo de retenção). No detector, a substância gera um sinal, que é interpretado na interface de processamento de dados. A figura 2 apresenta o esquema básico de um sistema de cromatografia líquida (LANÇAS, 2009; BLUM, 2014).

Figura 2 - Esquema básico de um sistema de cromatografia líquida



Fonte: Adaptado de (BLUM, 2014)

O detector mais utilizado em cromatografia líquida é o de ultravioleta-visível (UV-VIS), o qual, embora apresente capacidade de monitorar simultaneamente diversos comprimentos de onda, muitas vezes não possui a seletividade necessária para identificação do analito em meio a outras substâncias. Ao contrário, o detector de espectrometria de massas, por sua alta seletividade, pode realizar essa identificação sem dificuldades (BECCARIA; CABOOTER, 2020).

#### 1.4.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas tem suas origens no início do século XX, a partir dos experimentos de J. J. Thomson, e desde então está em constante aprimoramento, resultando no aumento do número de aplicações, tanto qualitativas como quantitativas, e ampliação expressiva da sensibilidade, posto que permite detectar concentrações na ordem de  $10^{-21}$ , por exemplo (KIRÁLY et al., 2016).

A principal característica da técnica se deve ao fato de que ela proporciona a identificação dos analitos, com base em sua relação massa/carga ( $m/z$ ), assegurando alta seletividade. Dessa maneira, em alguns casos, os espectrômetros de massas são indispensáveis ou até mesmo insubstituíveis (YAN et al., 2008; URBAN, 2016).

O esqueleto de um espectrômetro de massas é formado pela fonte de ionização, pelo analisador de massas (quadrupolos, *ion trap* e analisadores de tempo de voo – TOF, entre outros) e pelo detector (CASS; CASSIANO, 2015).

Resumidamente, após a entrada da amostra (em fase líquida no caso da cromatografia líquida) no sistema, a fonte de ionização se encarrega de formar

espécies eletricamente carregadas em fase gasosa. Uma vez formadas, essas espécies são direcionadas ao analisador, que separa os íons conforme sua relação  $m/z$ . Aliás, o analisador é componente que proporciona a alta seletividade da técnica. Os íons separados são conduzidos ao detector, onde produzem sinais elétricos. Estes, por sua vez, são processados, resultando no espectro de massas (URBAN, 2016).

Na prática, o espectro pode ser interpretado como um histograma, em que cada barra corresponde ao número de íons (abundância do íon) para cada relação massa/carga  $m/z$  (URBAN, 2016). A figura 3 ilustra a separação dos íons conforme a relação  $m/z$  e a subsequente formação do espectro de massas.

Figura 3 - O analisador e a formação do espectro de massas



Fonte: Adaptado de (SAURINA; SENTELLAS, 2019)

A figura 4 apresenta um diagrama esquemático com os componentes de um sistema de cromatografia acoplado ao espectrômetro de massas.

Figura 4 - Sistema de cromatografia acoplado ao espectrômetro de massas



Fonte: Adaptado de (ZHANG et al., 2016)

#### 1.4.2.1 As fontes de ionização

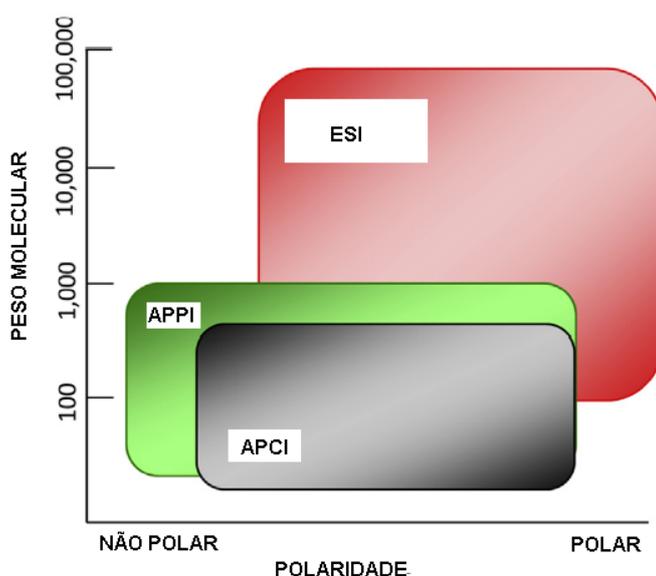
O grande desafio em conectar os espectrômetros de massas aos cromatógrafos líquidos, dado que os analisadores e detectores operam em condições

de vácuo, foi superado na década de 1980 pelo desenvolvimento de interfaces de ionização a pressão atmosférica (API), tais como: termospray (obsoleta), ionização por Eletrospray (ESI) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI) (ZHANG et al., 2016).

Posteriormente, no ano 2000 foi desenvolvida uma nova interface igualmente operante sob pressão atmosférica, ampliando o espectro de compostos analisados e tornando viável a aplicação da técnica para compostos que normalmente não são ionizáveis como os esteroides. Ela é uma variação da APCI e é conhecida como APPI, ou seja, fotoionização à pressão atmosférica (KAUPPILA et al., 2015; ZHANG et al., 2016).

A técnica de ESI, particularmente, foi desenvolvida pelo químico estadunidense John Fenn e colaboradores em 1989 e tornou-se a principal ferramenta do acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massas. Ela é uma forma branda de ionização, que possibilitou ampla análise de substâncias conforme pode ser observado na figura 5. Em virtude de sua imensa contribuição para a ciência, Fenn ganhou o Prêmio Nobel de 2002 (ZHANG et al., 2016; URBAN, 2016)

Figura 5 - Espectro analítico das técnicas ESI, APPI e APCI

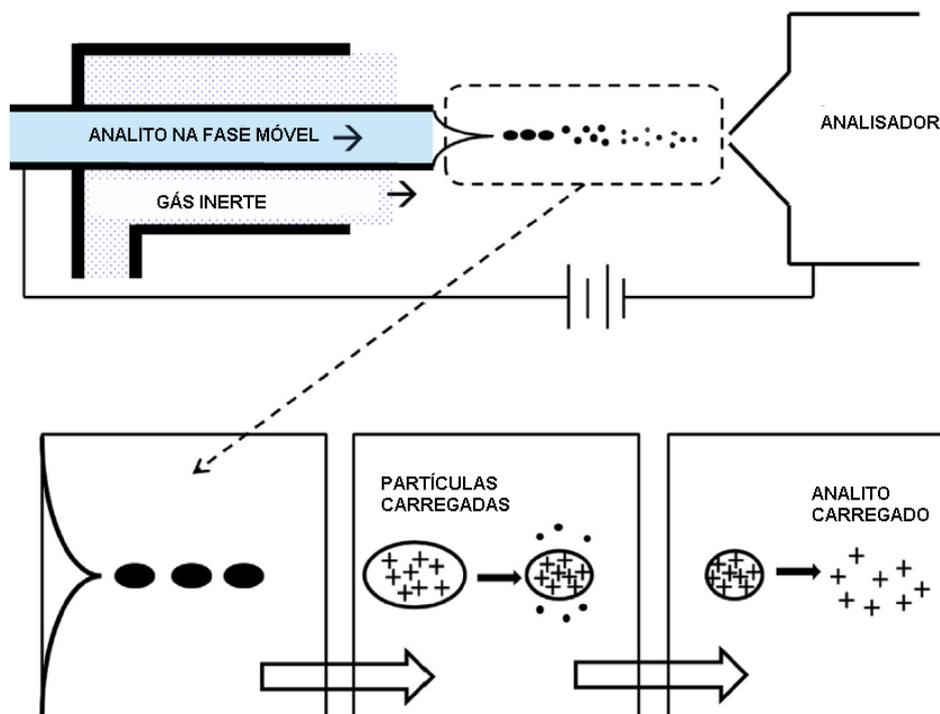


Fonte: Adaptado de (ZHANG et al., 2016).

A técnica de ESI consiste na formação de um aerossol de partículas eletricamente carregadas pela ação de alta voltagem, aquecimento e nebulização de

gás inerte. Esses elementos agem promovendo a evaporação do solvente (fase móvel líquida) e a redução do diâmetro das partículas. À medida que as gotículas reduzem de tamanho, a repulsão eletrostática aumenta e, então, ocorre o fenômeno de fissão coulômbica. A partir desse ponto, o analito eletricamente carregado (íon) fica livre de moléculas do solvente. Em seguida, é direcionado para o analisador, onde será separado conforme sua relação massa/carga  $m/z$  (ZHANG et al., 2016). A figura 6 apresenta um esquema da ionização por ESI.

Figura 6 - O processo da ionização por eletrospray (ESI)



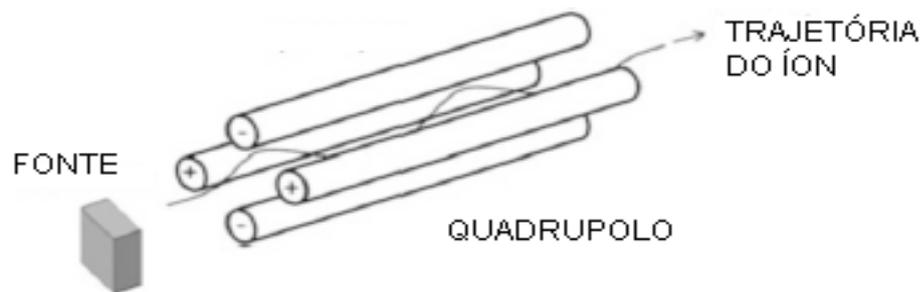
Fonte: (ZHANG et al., 2016).

#### 1.4.2.2 Analisadores de massas

No interior do analisador, o íon de interesse é separado segundo sua relação massa/carga  $m/z$ . Os tipos de analisadores mais frequentes são o *ion trap* (aprisionadores de íons), tempo de voo, transformada de Fourier e o quadrupolo. Ademais, também são comuns as combinações desses analisadores, inclusive formando arranjos híbridos (HAAG, 2016).

O quadrupolo é um dos mais utilizados. Ele é formado, como o próprio nome diz, por quatro cilindros paralelos. Seu funcionamento consiste na ação de corrente DC e radiofrequência (RF), que atuam selecionando os íons com determinada relação  $m/z$ . Por outro lado, os íons não selecionados colidem com as hastes do quadrupolo e não são detectados (HAAG, 2016).

Figura 7 - Analisador do tipo quadrupolo



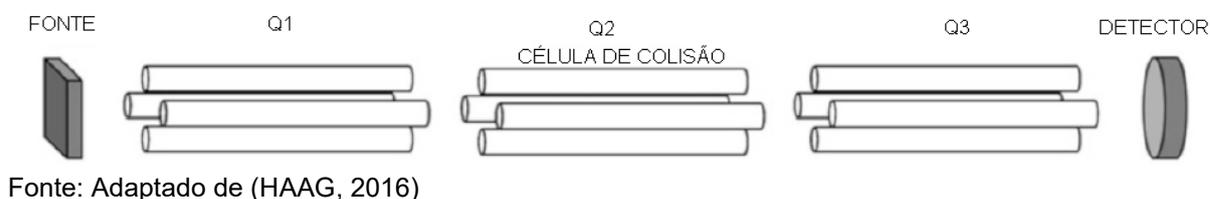
Fonte: (HAAG, 2016).

Frequentemente, o quadrupolo é associado a um ou mais analisadores, o qual pode ser outro quadrupolo ou o mesmo um analisador por tempo de voo. Esse tipo de combinação de analisadores consiste na espectrometria de massas sequencial (HAAG, 2016).

#### 1.4.2.2.1 Triplo quadrupolo e os tipos de escaneamento

O arranjo mais frequente de analisadores é o triplo quadrupolo (QQQ), em que há três quadrupolos alinhados em sequência, conforme mostrado na figura 8. Nesse tipo de arranjo, o primeiro e o terceiro analisadores são denominados Q1 e Q3, respectivamente, os quais ficam a cargo de filtrar/selecionar a relação  $m/z$  do íon em estudo. Ao contrário, o analisador Q2 opera apenas como câmara de colisão (CID). Ela é responsável por promover a fragmentação controlada do íon previamente selecionado em Q1 (HAAG, 2016). A propósito, em todos os modos de varredura em que há fragmentação do íon em Q2, a energia de colisão é uma variável que deve ser avaliada durante o desenvolvimento da metodologia (ZHANG et al., 2016).

Figura 8 - Analisador triplo quadrupolo



A configuração de analisadores em sequência do tipo QQQ possui grande versatilidade e permite a utilização de diversos tipos de varredura, como: varredura de íon produto, varredura de íon precursor, varredura de perda neutra, varredura de íons totais (*full scan*) e o monitoramento de reação selecionada (SRM) ou monitoramento de reações múltiplas (MRM) (HAAG, 2016; ZHANG et al., 2016).

A varredura de íon produto consiste em selecionar uma relação  $m/z$  em Q1, promover sua fragmentação em Q2 e analisar todos os fragmentos carregados em Q3, isto é, realizar um escaneamento de todos os íons decorrentes da quebra do íon estipulado em Q1. Ela auxilia na determinação de estruturas de espécies desconhecidas e na seleção de prováveis íons produtos para monitoramento.

Na varredura de íon precursor, ocorre o inverso do descrito anteriormente, pois os íons são escaneados em Q1, fragmentados em Q2 e apenas um íon é selecionado em Q3. Esse escaneamento contribui na elucidação de espécies que possuam um elemento estrutural em comum. Também pode ser utilizada na investigação de metabólitos (ZHANG et al., 2016).

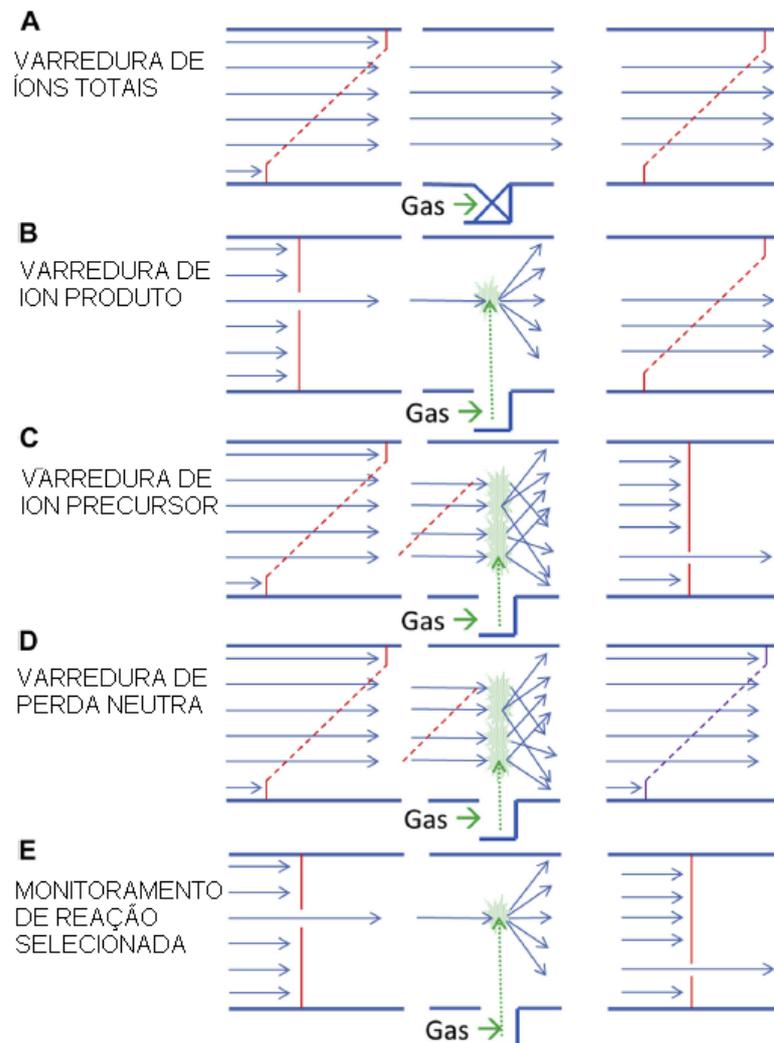
A varredura de perda neutra é utilizada para rastrear íons antes e após a perda de um grupamento neutro. Nesse modo, ambos os analisadores Q1 e Q3 são ajustados em modo de varredura completa, mas com uma diferença de massa (*offset*). Essa diferença é utilizada para determinar a massa de um grupo que esteja sendo analisado. O monitoramento da perda de H<sub>2</sub>O, por exemplo, pode ser utilizado para substâncias que contenham o grupamento hidroxila. Nesse caso, ajusta-se em 18 u (unidade de massa atômica unificada) a diferença entre Q1 e Q3 (ZHANG et al., 2016).

A varredura de íons totais é a forma mais simples. Os analisadores Q1 e Q3 escaneiam todos os íons presentes na amostra e o gás de colisão, em Q2, encontra-se desabilitado. Portanto, embora seja mais simples, nesse tipo de varredura não ocorre fragmentação, resultado um espectro amplo, completo e repleto de informações qualitativas (ZHANG et al., 2016).

A varredura de SRM é tipicamente utilizada para as análises quantitativas. Nesse tipo de escaneamento, tanto Q1 quanto Q3 atuam como filtros para seleção de determinada relação  $m/z$ , onde Q1 seleciona um íon precursor e Q3 seleciona o íon produto. Em Q2, ocorre a fragmentação controlada do íon precursor (HAAG, 2016; ZHANG et al., 2016).

Por fim, a varredura MRM. Ela é uma variante da SRM, com a diferença de que ela consiste na detecção simultânea de diferentes íons em Q3, promovendo confirmação adicional no processo de quantificação (HAAG, 2016; ZHANG et al., 2016). A figura 9 ilustra as técnicas de varreduras descritas.

Figura 9 - Escaneamentos no analisador triplo quadrupolo (QQQ)



Fonte: Adaptado de (ZHANG et al., 2016).

### 1.4.3 Desenvolvimento de metodologia

Devido à ausência em compêndios oficiais de metodologias para quantificação de sofosbuvir e GS-331007 em matrizes biológicas, é necessário o desenvolvimento e validação dessas metodologias para produzir resultados confiáveis, reprodutíveis e robustos. Diversos experimentos devem ser realizados a fim de alcançar a melhor condição instrumental e analítica. Ademais, as particularidades de cada matriz biológica devem ser atentamente examinadas (RAPPOLD, 2018).

Os testes de desenvolvimento das metodologias bioanalíticas consistem nas seguintes etapas: investigação das condições de análise da espectrometria de massas, cromatografia líquida e extração das amostras. Durante o desenvolvimento, diversos testes devem ser realizados a fim de avaliar previamente parâmetros que possam interferir na performance das metodologias, tais como: efeito matriz, seletividade, arraste (*carry over*), etc. Além disso, também devem ser avaliados o padrão interno a ser utilizado nas análises e a curva de calibração proposta para a quantificação das amostras (RAPPOLD, 2018).

#### *1.4.3.1 Investigação das condições analíticas da espectrometria de massas*

Essa etapa compreende o início do desenvolvimento da metodologia. Ela consiste na introdução de uma solução padrão dos compostos de interesse no espectrômetro de massas. A partir dos resultados, efetua-se a seleção da relação massa/carga  $m/z$  (íon precursor e produto) que se pretende monitorar. Além disso, durante essa etapa, as melhores condições da fonte de ionização também devem ser examinadas (RAPPOLD, 2018).

#### *1.4.3.2 Investigação das condições analíticas da cromatografia líquida*

Embora a espectrometria de massas possua alta seletividade, ela não consegue diferenciar espécies isobáricas, isto é, aquelas que apresentam massas idênticas. Além disso, os interferentes em matrizes tão complexas como os fluidos biológicos podem prejudicar a seletividade das análises.

Dessa forma, é indispensável que a metodologia cromatográfica promova boa resolução e possa quantificar com precisão e exatidão os compostos de interesse. Para atingir tal fim, durante o desenvolvimento, devem ser realizados testes cromatográficos, empregando-se diferentes colunas e fases móveis a fim de alcançar a melhor condição de análise (RAPOLD, 2018; LIU et al., 2019).

#### 1.4.3.3 *Investigação do método de extração das amostras*

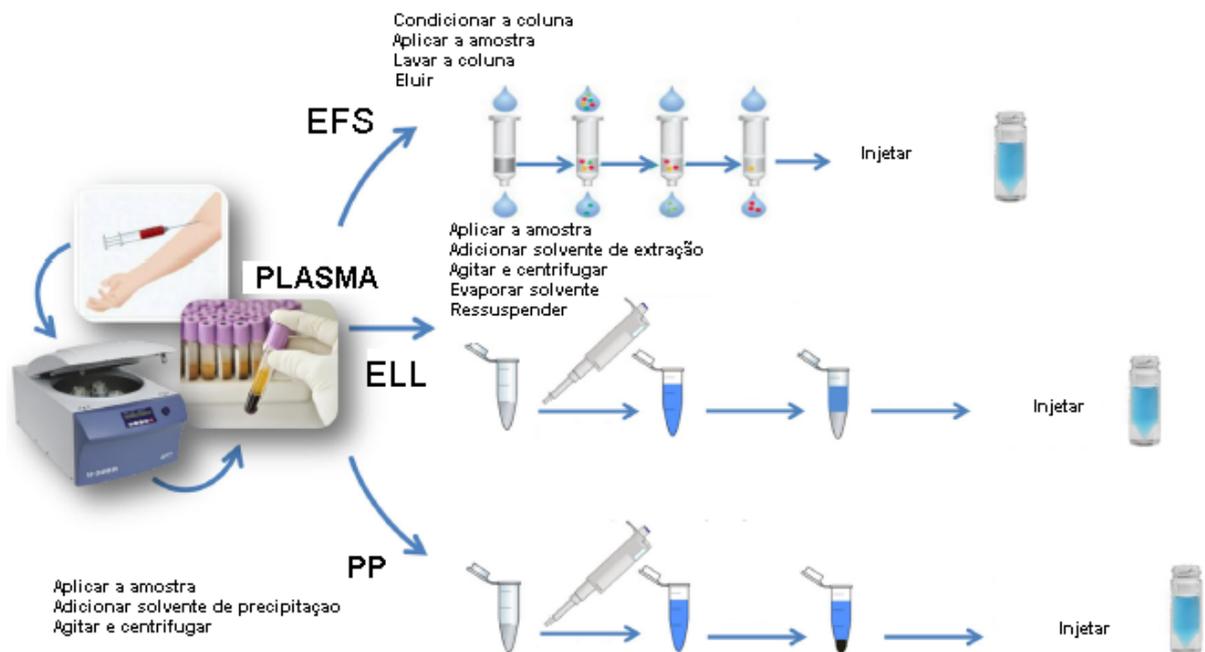
O estabelecimento do método de extração de amostras é uma etapa indispensável na elaboração da metodologia bioanalítica. Os fluidos biológicos são matrizes de alta complexidade e são formados por inúmeros componentes, como sais, carboidratos, proteínas e lipídios cuja presença pode gerar perturbações nas análises, prejudicando a qualidade analítica (INGLE et al., 2022).

Além de evitar e/ou minimizar interferências da matriz e promover a limpeza da amostra, a etapa de extração pode ser extremamente útil em casos em que há necessidade de concentrar previamente a amostra, podendo, até mesmo, reduzir o limite inferior de quantificação (CROTTI et al., 2015; NIU et al., 2018; CORTESE et al., 2020).

As três principais técnicas de extração adotadas nos estudos farmacocinéticos, embora não sejam as mais modernas como as extrações *online* e as microextrações em fase sólida, são: extração em fase sólida (EFS), extração líquido-líquido (ELL) e a precipitação de proteínas (PP) (CROTTI et al., 2015). Aliás, as duas primeiras são as mais utilizadas em metodologias bioanalíticas (INGLE et al., 2022).

Em termos gerais, as técnicas de EFS e ELL, quando comparadas à técnica de PP, geram maior seletividade, gerando extratos mais limpos e menor intensidade de supressão de sinal (CROTTI et al., 2015). A figura 10 ilustra os principais métodos de extração adotados nos estudos farmacocinéticos.

Figura 10 - Principais métodos de extração em estudos farmacocinéticos



Fonte: Adaptado de (CROTTI et al., 2015).

#### 1.4.3.3.1 A matriz plasma sanguíneo

Após a centrifugação do sangue coletado em tubo com ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA), que possui efeito anticoagulante, obtém-se o plasma. Devido à centrifugação, o plasma não possui células. Ele corresponde à fração líquida do sangue. Possui cor amarelo clara, sendo formado por água, proteínas, sais, glicose, hormônios, nutrientes, gases, lipídios, anticoagulante e fibrinogênio (LIMA-OLIVEIRA et al., 2018; MATHEW; SANKAR; VARACALLO, 2021; INGLE et al., 2022)

#### 1.4.3.3.2 A matriz líquor

O líquor ou líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluido límpido e incolor que está em contato íntimo com o cérebro e coluna vertebral. É fundamental para proteção e manutenção da homeostase do sistema nervoso central. Sua composição é semelhante a um ultrafiltrado do plasma, apresentando 99 % de água. Além disso, possui concentração elevada de alguns íons como o magnésio e menor concentração

de glicose, proteínas, aminoácidos, etc. (COMAR et al., 2009; FILIS; AGHAYEV; VRIONIS, 2017).

#### 1.4.3.3.3 A matriz fluido seminal

O fluido seminal (FS) humano consiste na mistura entre os espermatozoides e fluidos produzidos por diversas glândulas, tais como a próstata e as vesículas seminais. A próstata, por exemplo, contribui com a enzima fosfatase ácida, ácido cítrico, inositol, cálcio, zinco, magnésio e fosfolípídeos. A vesícula seminal, por sua vez, contribui significativamente com frutose, ácido ascórbico prostaglandinas e albumina (OWEN; KATZ, 2005; LAWRENTSCHUK; PERERA, 2016; ZHOU et al., 2015; HAUGEN; GROTMOL, 1998).

O fluido seminal possui o pH em torno de 7,7 e apresenta alta capacidade tamponante, a qual, aliás, é uma das maiores entre os fluidos corporais, promovendo um ambiente adequado para a fertilização no ambiente ácido do trato reprodutivo feminino (HAUGEN; GROTMOL, 1998; OWEN; KATZ, 2005; ZHOU et al., 2015; LAWRENTSCHUK; PERERA, 2016).

#### 1.4.3.4 *Delineamento da curva de calibração em matriz*

É fundamental que se faça a investigação e definição da faixa de trabalho adequada para a quantificação que se pretende efetuar. Essa faixa deve contemplar a concentração das amostras clínicas cujas concentrações devem estar dentro dos limites estabelecidos pela curva (ANVISA, 2012; KADIAN et al., 2016).

Para a construção dos calibradores em matriz biológica, soluções padrão de trabalho (concentrações conhecidas) são adicionadas nas matrizes biológicas brancas (procedimento de fortificação). Nos métodos bioanalíticos, considera-se linear a curva cujo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) seja superior a 0,98 (ANVISA, 2012; KADIAN et al., 2016).

#### *1.4.3.5 Avaliação de controles de qualidade em matriz*

Os controles de qualidade em matriz biológica são preparados pela adição de solução padrão do analito de concentração conhecida à matriz biológica branca. Eles são elementos importantes no desenvolvimento da metodologia, pois proporcionam a verificação da precisão e exatidão da determinação (ANVISA, 2012; KADIAN et al., 2016).

#### *1.4.3.6 Investigação do padrão interno*

Para aumentar a precisão, exatidão e robustez da metodologia bioanalítica, é recomendada a utilização de padrão interno (ANVISA, 2012). Para as metodologias bioanalíticas por LC-MS/MS, sugere-se que o próprio analito marcado por isótopo seja adotado como padrão interno. Ele apresenta comportamento similar ao do analito (não marcado) e está sujeito ao mesmo efeito matriz. Porém, apresenta alto custo e pode não estar disponível comercialmente (LOOS; SCHEPDAEL; CABOOTER, 2016; RAPPOLD, 2018; CORTESE et al., 2020).

#### *1.4.3.7 Avaliação do efeito de matriz e seletividade*

A investigação do efeito matriz consiste no estudo do efeito que as diversas substâncias presentes na matriz podem causar na recuperação e quantificação do analito. Tais variações podem prejudicar a qualidade analítica dos resultados, uma vez que comprometem a precisão e exatidão da metodologia. Uma vez identificada a variação, torna-se necessária sua investigação para que a perturbação seja corrigida (ANVISA, 2012; KADIAN et al., 2016; CORTESE et al., 2020).

A apreciação da seletividade contempla a inspeção de brancos em matriz biológica e amostras do limite inferior de quantificação. Examina-se a presença de eventual sinal cromatográfico no tempo de retenção do analito e do padrão interno nas amostras branco, as quais não possuem nem analito nem padrão interno. Caso ocorra sinal cromatográfico indesejado, recomenda-se a investigação do problema para que ele possa ser reduzido e até mesmo eliminado (ANVISA, 2012; KADIAN et al., 2016).

#### 1.4.3.8 Avaliação do arraste

O estudo do arraste (*carry over*) é realizado para avaliar a contaminação entre as injeções. Caso o ocorra, suas causas devem ser prontamente investigadas e o problema deve ser corrigido, pois pode prejudicar a precisão e exatidão da metodologia (ANVISA, 2012; KADIAN et al., 2016).

#### 1.4.3.9 Avaliação de substâncias potencialmente interferentes

A interferência analítica de metabólitos, medicamento concomitante, isto é, administrado durante a coleta das amostras clínicas concomitantemente ao medicamento em estudo, e outros potenciais interferentes deve ser investigada. Caso a interferência esteja presente, deve ser minimizada ou eliminada, pois pode comprometer a qualidade analítica dos resultados (ANVISA, 2012; KADIAN et al., 2016).

### 1.5 Validação

Os fluidos biológicos, por serem matrizes de alta complexidade, podem acarretar variações indesejáveis nas análises. A supressão iônica e o aumento de sinal por exemplo, podem prejudicar o desempenho da metodologia e causar severos prejuízos na precisão e exatidão, levando a resultados inconclusivos. Portanto, é fundamental que a metodologia seja submetida ao processo de validação, que vai garantir resultados analíticos confiáveis (LOOS; SCHEPDAEL; CABOOTER, 2016)

A validação demonstra, por meio de ensaios específicos, que a metodologia se apresenta adequada para o que se propõe. Ela fornece informações relevantes tais como a seletividade, efeito de matriz, linearidade e precisão, exatidão e dados sobre a estabilidade dos analitos (HOPFGARTNER, 2020).

Em geral, os requisitos de validação das agências regulatórias pelo mundo são congruentes. Porém, alguns critérios e ensaios ainda possuem diferenças, podendo impactar no momento da submissão de uma pesquisa em determinado local (KADIAN et al., 2016).

Este projeto se propôs a realizar o desenvolvimento e posterior validação das metodologias para quantificação de sofobuvir e seu principal metabólito (GS-331007) em diferentes matrizes biológicas (plasma, líquor e fluido seminal). O guia para validação de metodologias bioanalíticas da ANVISA, a resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, foi utilizado como referência. De acordo com o guia, os seguintes ensaios devem ser realizados:

- teste de seletividade;
- teste de seletividade na presença de substâncias potencialmente interferentes;
- teste de efeito de matriz;
- teste de efeito de matriz na presença de substâncias potencialmente interferentes;
- avaliação da contaminação cruzada ou efeito de arraste (*carry over*);
- avaliação da linearidade;
- avaliação da precisão e exatidão;
- avaliação da diluição;
- avaliação da estabilidade do analito em matriz biológica;
- avaliação da estabilidade do analito e padrão interno em solução.

## 1.6 Justificativa

Embora o quadro clínico de Zika seja leve e autolimitado, a ocorrência de complicações neurológicas graves como Síndrome de Guillain-Barré e microcefalia é motivo de grande preocupação (PERGOLIZZI et al., 2021).

O sofosbuvir, um antiviral utilizado no tratamento da Hepatite C, vem sendo testado contra o vírus Zika e outros importantes agentes. Pesquisas recentes em meios celulares e animais sinalizaram resultados promissores do sofosbuvir frente ao vírus da Zika (SOUZA et al., 2017a, 2017b; MESCI et al., 2018; GARDINALI et al., 2020; BOCCUTO et al., 2021) Entretanto, ainda não havia sido realizado um estudo com humanos que investigue o fármaco em um contexto relacionado à Zika.

Nesse sentido, esta pesquisa objetivou desenvolver e validar metodologias bioanalíticas para determinação precisa e exata de sofosbuvir e seu principal metabólito (GS-331007) em plasma, líquor e fluido seminal humano. A propósito, até o momento, não há publicações sobre a quantificação das referidas substâncias nas matrizes líquor e fluido seminal.

Objetivou-se também, aplicar as metodologias na análise de amostras reais dos participantes de um ensaio clínico piloto pioneiro com foco em Zika. A partir das análises, foi possível apurar os níveis de sofosbuvir e GS-331007 em sítios acometidos pelo ZIKV, tais como os sistemas nervoso central e reprodutivo masculino.

Portanto, este estudo se propôs a desenvolver e validar novas metodologias a fim de investigar sobre características farmacocinéticas dos compostos analisados que, até então, eram desconhecidas. Assim, a partir do conhecimento produzido, almeja-se fomentar e nortear novos projetos, que também poderão contribuir para o enfrentamento da Zika pelos sistemas de saúde.

Além disso, as metodologias poderão ser extremamente úteis para aplicação em estudos futuros e, assim, poderão fornecer resultados confiáveis com a velocidade necessária. Aliás, há uma grande urgência para novas investigações, pois, considerando a inexistência de vacina e medicamento, a possibilidade de novo surto de Zika ainda é uma ameaça à saúde pública global (PERGOLIZZI et al., 2021; GUO et al., 2022).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver e validar metodologias bioanalíticas por LC-MS/MS para apurar as concentrações de sofosbuvir e seu principal metabólito (GS-331007) em plasma, líquido e fluido seminal humano. Aplicar as metodologias em amostras reais de participantes de um ensaio clínico piloto com foco em Zika.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver e validar metodologia bioanalítica por LC-MS/MS para determinação simultânea de sofosbuvir e GS-331007 em plasma humano, conforme a RDC nº 27/2012 da ANVISA;
- Desenvolver e validar metodologia bioanalítica por LC-MS/MS para determinação simultânea de sofosbuvir e GS-331007 em líquido humano, conforme a RDC nº 27/2012 da ANVISA;
- Desenvolver e validar metodologia bioanalítica por LC-MS/MS para determinação simultânea de sofosbuvir e GS-331007 em fluido seminal humano, conforme a RDC nº 27/2012 da ANVISA;
- Analisar as amostras de plasma, líquido e fluido seminal dos participantes do ensaio clínico e determinar características farmacocinéticas de sofosbuvir e GS-331007;
- Avaliar os resultados e a penetração de sofosbuvir e GS-331007 no sistema nervoso central e reprodutivo masculino.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O Laboratório de Equivalência e Farmacocinética (SEFAR) da Fiocruz realizou a etapa analítica desta pesquisa e foi responsável pela subcontratação da etapa clínica, que foi realizada no instituto de pesquisa Scentryphar Pesquisa Clínica Ltda. Este trabalho também foi acompanhado pelo Instituto de Infectologia (INI) da Fiocruz.

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Equipamentos, instrumentos e consumíveis de uso geral

A tabela 2 apresenta os equipamentos, instrumentos e consumíveis de uso geral utilizados na elaboração deste trabalho.

Tabela 2 - Equipamentos gerais, instrumentos e consumíveis

Item	Marca	Modelo
Agitador de tubos/microtubos	Labnet	Vortex mixer S0200
Balança de precisão 0.00001g	Shimadzu	AUW – 220 D
Concentrador de amostras (N <sub>2</sub> )	Techne	FDB03DP
Pipeta repetidora	Brand	HandyStep (1 - 5 mL)
Freezer -70 °C	Sanyo	MDF-U54VC
Microcentrifuga refrigerada	Thermo	Sorvall Legend Micro 21R
Sistema de purificação de água	Millipore	Milli-Q Integral 10
Micropipeta de volume variável	Gilson/Brand	P100, P200 e P1000
Capela de exaustão	Alba Johnson	AT100
Ultrassom	Unique	USC2800A
Balão volumétrico (volumes diversos)	Laborglas	Não se aplica
Proveta Graduada (volumes diversos)	Laborglas	Não se aplica
Insert com mola	Analítica	Não se aplica
Vial de 2 mL	Analítica	Não se aplica
Tampa com rosca para vial	Analítica	Não se aplica
Ponteiras para pipetas	Kasvi	P200, P1000
Microtubo de polipropileno	Olen	2 mL
Tubo tipo falcon de 15 mL	Olen	15 mL
Tubo tipo falcon de 50 mL	Olen	50 mL

Fonte: (Do autor, 2022).

### 3.1.2 Componentes para análise e identificação

A tabela 3 aponta os componentes e equipamentos utilizados diretamente na análise. As colunas cromatográficas também estão indicadas na tabela.

Tabela 3 - Componentes, equipamentos e colunas cromatográficas

<b>Componente</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Descrição</b>
Coluna Analítica	Phenomenex	Gemini NX-C18 5µm, 4.6 x 50 mm
Coluna Analítica	Phenomenex	Gemini C18 5µm, 4.6 x 150 mm
Coluna Analítica	ACE	ACE C8 5µm, 4.6 x 100 mm
Espectrômetro de massas	ABSCIEX	QTRAP 4500 LC-MS/MS
Software	Analyst	1.6.1
Bomba	Shimadzu	NEXERA - LC-20ADXR
Injetor automático	Shimadzu	NEXERA - SIL-20ACXR
Degaseificador	Shimadzu	DGU-20A5R
Forno de coluna	Shimadzu	CTO-20AC

Fonte: (Do autor, 2022).

### 3.1.3 Substâncias químicas de referência, medicamento e reagentes

A tabela 4 abaixo apresenta dados sobre as substâncias químicas de referência (SQR) utilizadas no desenvolvimento, validação e análise de amostras clínicas. Devido à indisponibilidade de SQR's farmacopeicas de sofosbuvir e GS-331007, foram utilizadas SQR's caracterizadas, que foram doadas pela Microbiológica Farmacêutica.

Tabela 4 - Substâncias químicas de referência

<b>SQR</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>Uso</b>	<b>Origem</b>
Sofosbuvir	99,4	Analito	Microbiológica Farmacêutica
GS-331007	100,0	Analito	Microbiológica Farmacêutica
Cimetidina	100,2	Padrão interno	Farmacopeia Brasileira
Zidovudina	99,4	Padrão interno	Farmacopeia Brasileira
Diazepam	99,9	Padrão interno	Farmacopeia Brasileira
Nicotina	99,9	Interferente	Farmacopeia Americana (USP)
Cafeína	100,8	Interferente	Sigma Aldrich

Fonte: (Do autor, 2022).

A tabela 5 contém informações do medicamento de referência utilizado na etapa clínica do estudo farmacocinético piloto.

Tabela 5 - Medicamento de referência

<b>Sovaldi®</b>	
Princípio ativo	Sofosbuvir
Forma farmacêutica	Comprimido revestido
Dose	400 mg
Lote	WPZB

Fonte: (Do autor, 2022).

A tabela 6 apresenta os reagentes e solventes empregados nas análises.

Tabela 6 - Reagentes utilizados no trabalho

<b>Reagentes e Solventes</b>	<b>Fabricante</b>
Metanol grau HPLC	Tedia
Acetonitrila grau HPLC	J.T.Baker
Ácido Fórmico 98 - 100% ACS	Scharlau
Água ultrapura	Milli-Q
Acetato de etila	Tedia
Éter etil-terc-butílico (TBME)	Scharlau

Fonte: (Do autor, 2022).

### 3.2 Matriz biológica branca

Plasma, líquor e fluido seminal brancos, isto é, isentos do analito e padrão interno foram coletados de homens e mulheres que não tomaram o medicamento (Sovaldi®). Eles receberam todas as orientações sobre a pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A). A matriz branca foi utilizada em todas as etapas deste estudo: desenvolvimento, validação e quantificação das amostras clínicas.

Para obtenção do plasma branco, homens e mulheres saudáveis tiveram amostras de sangue coletadas em tubos EDTA K3. A coleta foi realizada por punção venosa e então submetida à centrifugação (1000 g por 10 min em 4 °C), sendo o

plasma acondicionado em tubo criogênico. O líquido, por sua vez, foi coletado de 8 homens saudáveis por punção lombar, com auxílio de seringa e agulha, sendo acondicionado em tubo criogênico. Para finalizar, o fluido seminal foi coletado em recipiente plástico (frasco de coleta de urina) pelo próprio indivíduo por masturbação, sendo acondicionado em tubo criogênico. Os brancos de matriz foram armazenados em *freezer* -70 °C até o momento da utilização.

Cabe destacar que as coletas de matriz branca foram realizadas/supervisionadas por profissionais de saúde habilitados em uma unidade de internação hospitalar.

### 3.3 Desenvolvimento de metodologias bioanalíticas

As metodologias bioanalíticas foram desenvolvidas e então validadas a fim de proporcionar a quantificação confiável e simultânea de sofosbuvir e GS-331007 em plasma, líquido e fluido seminal humano.

Antes de iniciar o desenvolvimento, foi necessário fazer um levantamento na literatura acerca de dados sobre as moléculas objeto de estudo (sofosbuvir e GS-331007) e de potenciais candidatos a padrão interno. Foram realizadas buscas na base Pubmed utilizando os descritores “*assay*”, “*sofosbuvir*”, “*GS-331007*”, “*method*”, “*determination*”, “*quantification*” e “*bioanalysis*”.

Como resultado do levantamento realizado, foram obtidos diversos artigos e informações, que contribuíram significativamente na elaboração deste trabalho.

Em primeiro lugar, de posse das informações obtidas, foram preparadas as seguintes soluções analíticas:

- solução padrão dos analitos sofosbuvir e GS-331007;
- solução padrão dos candidatos a padrão interno;
- solução padrão das substâncias potencialmente interferentes;

Essas soluções foram posteriormente utilizadas nos experimentos conduzidos ao longo do desenvolvimento. Tais experimentos foram fundamentais na investigação dos seguintes elementos, os quais precisam ser bem estabelecidos antes de iniciar a validação da metodologia:

- condições analíticas da espectrometria de massas;
- condições analíticas da cromatografia líquida;
- metodologia para extração das amostras;
- avaliação preliminar de efeito matriz;
- avaliação preliminar de seletividade;
- avaliação preliminar de arraste (*carry over*);
- avaliação preliminar da perturbação de potenciais interferentes;
- estabelecimento do limite inferior de quantificação;
- delineamento da curva de calibração em matriz biológica;
- avaliação preliminar dos controles de qualidade em matriz biológica;
- avaliação preliminar da diluição das amostras;
- definição do padrão interno a ser empregado nas análises.

### 3.3.1 Solução dos analitos sofosbuvir e GS-331007

Soluções padrão dos analitos (sofosbuvir e GS-331007) foram preparadas a partir de pesagem das SQR's das referidas substâncias. Elas foram utilizadas ao longo do desenvolvimento das metodologias.

Pesou-se 10 mg de cada SQR alvo em balança de precisão devidamente calibrada e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, o volume do balão foi completado com solvente apropriado até o menisco, resultando na solução mestre (SME) de concentração 1 mg/mL (1.000.000 ng/mL). Posteriormente, a SME foi diluída, originando soluções denominadas soluções padrão de trabalho.

Conforme literatura, os trabalhos relatam o uso de dimetilsulfóxido, metanol e água como diluente das soluções (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; SHI et al., 2015; PAN et al., 2016; ARIAUDO et al., 2016; ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017; NOTARI et al., 2018; SEMREEN et al., 2019; SEYEN et al., 2019; FERRARI et al., 2019).

Dentre os solventes utilizados nas publicações científicas, o dimetilsulfóxido não estava disponível para os testes. Portanto, foram avaliados apenas o metanol e a água como diluentes das soluções. Os resultados obtidos estão na seção 4.1.1. As soluções foram armazenadas em *freezer* -70 °C por 5 dias.

### 3.3.2 Solução dos candidatos a padrão interno

As publicações encontradas na literatura científica apresentam diferentes substâncias como padrão interno nas determinações de sofosbuvir e GS-331007 em matrizes biológicas, tais como:

- **analito marcado por isótopo** ( $[^2\text{H}_6]$ -sofosbuvir e  $[^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3]$ -GS-331007): determinação em plasma humano (SEYEN et al., 2019; FERRARI et al., 2019);
- **analito marcado por isótopo** ( $[^{13}\text{C} \text{ } ^2\text{H}_3]$ -sofosbuvir e  $[^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3]$ -GS-331007): determinação em plasma e urina de origem humana (SHEN et al., 2019);
- **famotidina**: análise em plasma humano (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015)
- **midazolam**: análise em plasma de ratos (SHI et al., 2015);
- **diazepam**: análise em plasma de ratos (PAN et al., 2016);
- **quinoxalina**: análise em plasma humano (ARIAUDO et al., 2016);
- **daclatasvir**: análise em plasma humano (ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017);
- **quinoxalina**: análise em plasma humano (NOTARI et al., 2018);
- **cetotifeno**: análise em plasma humano (SEMREEN et al., 2019);
- **zidovudina**: análise em plasma e fluido amniótico de macacos (GARDINALI et al., 2020).

Embora o analito marcado por isótopo seja considerado o padrão interno ideal, não havia previsão orçamentária para sua aquisição (RAPOLD, 2018; CORTESE et al., 2020). Então, foi necessário pesquisar outras substâncias que pudessem ser utilizadas como padrão interno.

Entre as substâncias listadas, apenas a zidovudina e o diazepam estavam disponíveis no laboratório. Além delas, a SQR de cimetidina também estava disponível para uso imediato. Ela pertence à classe da famotidina (antagonista do receptor H2 da histamina) e foi utilizada como padrão interno na metodologia para determinação

simultânea de sofosbuvir e GS-331007 em plasma humano (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015).

Sendo assim, as substâncias zidovudina, diazepam e cimetidina foram selecionadas e incluídas nos testes para definição do padrão interno das metodologias em desenvolvimento. O preparo das soluções estoque e de trabalho foi conduzido da mesma forma dos analitos, inclusive utilizando os mesmos diluentes (metanol e água). Os resultados obtidos estão na seção 4.1.2. As soluções foram armazenadas em *freezer* -70 °C por 5 dias.

### 3.3.3 Soluções das substâncias potencialmente interferentes

De acordo com o a resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA, o estudo dos potenciais interferentes consiste na investigação da interferência analítica de medicamentos concomitantes, nicotina e cafeína.

Como não houve administração de medicamento concomitante durante a etapa clínica do estudo, apenas a nicotina e a cafeína foram selecionadas para a investigação. Então, soluções padrão dessas substâncias foram preparadas seguindo as mesmas condições das soluções dos analitos. Elas foram descartadas logo após a utilização.

### 3.3.4 Investigação das condições analíticas da espectrometria de massas

A investigação dos parâmetros do espectrômetro de massas é realizada sem o uso de coluna cromatográfica e é uma etapa fundamental em uma metodologia bioanalítica.

Primeiramente, executou-se o procedimento denominado Infusão direta, que consiste no bombeamento contínuo de soluções dos analitos e candidatos a padrão interno para o interior do espectrômetro com o propósito de obter os espectros de massas e, assim, definir os parâmetros de monitoramento:

- modo de detecção (positivo ou negativo);
- relação entre a massa e a carga  $m/z$  do íon precursor e produto;

- potencial de declusterização/desagrupamento DP (*Declustering Potential*);
- voltagem de entrada EP (*Entrance Potential*);
- voltagem da célula de colisão CE (*Collision Energy*);
- voltagem de saída da célula de colisão CXP (*Collision Cell Exit Potential*);
- voltagem do spray de íons IS (*Ionspray Voltage*);
- tempo de varredura (*dwell time*).

Entre os parâmetros examinados, vale destacar a relação massa/carga  $m/z$ , que compreende a razão entre a massa e a carga do íon em estudo. Ela possui grande importância, pois está diretamente associada à substância infundida, ou seja, é um parâmetro dependente da substância e, por isso, proporciona a alta seletividade da técnica. Conforme recomendado na literatura, foram selecionadas duas transições para monitoramento: a transição de quantificação (mais intensa) e a transição de qualificação/confirmação (segunda mais intensa) (RAPPOLD, 2018).

Posteriormente à Infusão direta, foi realizado o procedimento denominado Espectrometria de massas por injeção em fluxo (FIA). Ele consiste na introdução dos analitos no espectrômetro de massas por meio do autoinjeter do cromatógrafo, sendo realizadas injeções sequenciais dos analitos com objetivo de definir as melhores condições da fonte (parâmetros da fonte) para a análise. Tais condições consistem em:

- fluxo de gás de colisão - gás CAD;
- fluxo de gás de cortina - gás CUR (gás de contracorrente);
- fluxo do gás de nebulização - gás GS1;
- fluxo do gás de aquecimento/secagem - gás GS2;
- temperatura da fonte -TEM.

### 3.3.5 Investigação das condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram investigadas a partir de estudos da literatura acerca da determinação simultânea de sofosbuvir e GS-331007 em matrizes biológicas. Foi observado que as colunas cromatográficas C18 (octadecilsilano) de 50 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro e com partícula de tamanho reduzido (1,6 a 1,8  $\mu\text{m}$ ) foram as mais frequentemente utilizadas (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; SHI et al., 2015; ARIAUDO et al., 2016; PAN et al., 2016; NOTARI et al., 2018; SEMREEN et al., 2019; SEYEN et al., 2019; FERRARI et al., 2019). Devido ao reduzido tamanho de partícula (menor ou igual a 2,0  $\mu\text{m}$ ), esse tipo de coluna requer sistemas capazes de suportar pressões superiores às observadas na cromatografia líquida convencional e, por esse motivo, não foi avaliada (MALDANER; JARDIM, 2012).

Todavia, também há trabalhos que empregaram outros tipos de colunas: o estudo de Abdallah, Abdel-Megied e Gouda (2017), que utilizou uma coluna C8 (octasilano) de 50 mm de comprimento, 4.6 mm de diâmetro e tamanho de partícula de 5.0  $\mu\text{m}$ , e o estudo de Shen e colaboradores (2019), que efetuou as análises em uma coluna C6-fenil (hexilsilano-fenil) de 50 mm de comprimento, 3.0 mm de diâmetro e tamanho de partícula de 3.0  $\mu\text{m}$ .

Em relação à fase móvel, as publicações disponíveis mostram a utilização de água e solventes orgânicos, tais como acetonitrila, metanol ou uma mistura de ambos. Há também trabalhos que empregaram tampões (acetato de amônio 5 mM, formiato de amônio 5 e 10 mM e ácidos voláteis (ácido fórmico a 0,005 % e 0,1 %, v/v) (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; SHI et al., 2015; ARIAUDO et al., 2016; PAN et al., 2016; ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017; NOTARI et al., 2018; SEMREEN et al., 2019; SHEN et al., 2019; SEYEN et al., 2019; FERRARI et al., 2019; GARDINALI et al., 2020).

No que diz respeito à forma de eluição, observou-se que os modos gradiente e isocrático com a temperatura da coluna mantida entre 20 e 50  $^{\circ}\text{C}$  foram os mais utilizados. Além disso, o tempo de análise foi de 1,2 a 12 minutos (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; SHI et al., 2015; ARIAUDO et al., 2016; PAN et al., 2016; ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017; NOTARI et al., 2018; SEMREEN et al.,

2019; SHEN et al., 2019; SEYEN et al., 2019; FERRARI et al., 2019; GARDINALI et al., 2020).

Diante do exposto, os testes os foram conduzidos variando-se os seguintes elementos cromatográficos:

- colunas C8 e C18: (a) Phenomenex Gemini NX-C18 5 µm, 4,6 x 50 mm; (b) Phenomenex Gemini C18 5 µm, 4,6 x 150 mm; (c) ACE C8 5 µm, 4,6 x 100 mm;
- fase móvel: composta por acetonitrila, metanol, e água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v) em diferentes proporções;
- fluxo de fase móvel: até 1,0 mL/min;
- volume de injeção: 10 a 20 µL;
- temperatura do forno de coluna: 22 a 45 °C.
- solução de lavagem do sistema: metanol e água em diferentes proporções.

### 3.3.6 Investigação do método de extração das amostras

Segundo estudos da literatura, a extração de sofosbuvir e GS-331007 de matrizes biológicas foi conduzida, principalmente, por meio das técnicas de precipitação de proteínas (PP) e extração líquido-líquido (ELL):

- **precipitação de proteínas:** (SHI et al., 2015; PAN et al., 2016; NOTARI et al., 2018; SEYEN et al., 2019; FERRARI et al., 2019);
- **extração líquido-líquido:** (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017; SEMREEN et al., 2019; SHEN et al., 2019; GARDINALI et al., 2020);

Posto isso, os testes de extração foram conduzidos em microtubo de polipropileno de 2 mL utilizando-se as referidas técnicas. Os experimentos foram iniciados pelo plasma, pois havia maior disponibilidade de matriz branca. Esses ensaios objetivaram proporcionar recuperação homogênea e garantir a

eliminação/redução de interferentes, minimizando o efeito matriz e assegurando a reprodutibilidade e exatidão das análises.

Para a técnica de precipitação de proteínas, a acetonitrila foi testada como agente precipitante. Segundo os autores Shi e colaboradores (2015), Pan e colaboradores (2016) e Ferrari e colaboradores (2019) esse agente apresentou melhor resultado quando comparado ao metanol. Para a extração líquido-líquido, os testes foram realizados com os solventes que estavam disponíveis no laboratório: acetato de etila e éter etil-terc-butílico (TBME).

Durante a investigação do método de extração das amostras, o volume requerido de matriz para cada amostra analisada também foi avaliado. Nas técnicas de extração por PP disponíveis na literatura, o consumo de matriz foi de 50 a 100  $\mu\text{L}$  para cada análise. Por outro lado, dentre os estudos que utilizaram a técnica de ELL, observou-se um elevado consumo de matriz biológica (450 a 500  $\mu\text{L}$ ). Assim, visando obter uma metodologia em que volume de matriz empregado para cada análise fosse reduzido, foram testados os volumes de 50 e 100  $\mu\text{L}$  de matriz biológica.

Ademais, também foi objeto de investigação o volume de ressuspensão do resíduo remanescente (pós-evaporação do extrato orgânico). Verificou-se que nos trabalhos de Rezk, Basalious e Karim (2015) e Gardinali e colaboradores (2020), os resíduos foram ressuspensos em 150  $\mu\text{L}$ , enquanto que em Abdallah, Abdel-Megied e Gouda (2017) esse volume foi de 300  $\mu\text{L}$ . Já no estudo de Semreen e colaboradores (2019) e Notari e colaboradores (2018), o volume de ressuspensão foi de 500  $\mu\text{L}$ . Vale apontar que a publicação de Shen e colaboradores (2019) não informa sobre o volume de ressuspensão adotado.

Objetivou-se ressuspender o resíduo obtido no maior volume possível, pois poderia ocasionar efeitos positivos na metodologia, tais como: produzir amostras mais limpas; aumentar o tempo de vida útil da coluna cromatográfica e reduzir/eliminar a possibilidade de contaminação cruzada entre as injeções (*carry over*). Assim, foram testados diferentes volumes de ressuspensão, sendo adotado o maior volume que permitisse uma resposta analítica adequada.

### 3.3.7 Avaliação preliminar de parâmetros da validação

Com o objetivo de prevenir eventuais contratemplos no decorrer da validação das metodologias, foram conduzidos experimentos em condições similares ao definido pela legislação para validação da ANVISA (Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012). Nos testes, foram avaliados os seguintes elementos: efeito matriz, seletividade, arraste; grau de perturbação de potenciais interferentes (nicotina e cafeína); precisão e exatidão e processo de diluição. Vale ressaltar que, em nenhuma hipótese, os testes preliminares substituem os ensaios de validação.

### 3.3.8 Estabelecimento do limite inferior de quantificação (LIQ)

As publicações presentes na literatura sobre a determinação simultânea de sofobuvir e GS-331007 em matrizes biológicas apresentam o limite inferior de quantificação entre 0,30 ng/mL a 15,6 ng/mL para o sofobuvir e 2 a 39,1 ng/mL para o metabólito GS-331007. Relatam ainda a utilização de 50 a 500 µL da matriz biológica para cada amostra analisada (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; SHI et al., 2015; ARIAUDO et al., 2016; PAN et al., 2016; ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017; NOTARI et al., 2018; SEMREEN et al., 2019; SHEN et al., 2019; SEYEN et al., 2019; FERRARI et al., 2019; GARDINALI et al., 2020).

As concentrações testadas foram iguais a 0,10 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,50 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL, 5 ng/mL e 10 ng/mL. O preparo dessas amostras foi realizado pela adição de solução dos analitos de concentração conhecida à matriz branca, isto é, isenta de analito e padrão interno. Objetivou-se alcançar o menor limite de quantificação de forma a proporcionar a quantificação precisa e exata conforme legislação vigente, isto é, coeficiente de variação menor ou igual a 20 % e exatidão entre 80 e 120 %.

### 3.3.9 Delineamento da curva de calibração em matriz

A resolução da ANVISA (2012) exige que as curvas de calibração sejam preparadas na matriz biológica e que possuam, no mínimo, 6 níveis de concentração, incluindo o LIQ e o LSQ. Segundo Cortese e colaboradores (2020), a construção da

curva em matriz contribui para a compensação do efeito matriz e, conseqüentemente, para a redução de erros na apuração da concentração das amostras clínicas.

Neste estudo, os pontos de calibração foram preparados por meio do procedimento de fortificação da matriz branca (isenta de analito e padrão interno), que consiste na adição de quantidades conhecidas dos analitos (solução padrão de trabalho) à matriz A propósito, esse procedimento também foi empregado nas publicações disponíveis sobre a determinação quantitativa de sofosbuvir e seu metabólito em matrizes biológicas (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; SHI et al., 2015; ARIAUDO et al., 2016; PAN et al., 2016; ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017; NOTARI et al., 2018; SEMREEN et al., 2019; SEYEN et al., 2019; FERRARI et al., 2019).

A concentração do limite inferior da curva foi estabelecida conforme descrito na seção 3.3.8. De outro modo, o limite superior foi definido com base em dados de curvas analíticas da literatura, sendo observados valores de 1000 a 3000 ng/mL para o sofosbuvir e 1500 a 10000 ng/mL para o metabólito (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; ARIAUDO et al., 2016; ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017; NOTARI et al., 2018; SEMREEN et al., 2019; SHEN et al., 2019; SEYEN et al., 2019; FERRARI et al., 2019). Além disso, conforme sugerido por Kadian e colaboradores (2016), as informações sobre a concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ) também serviram como fonte de consulta para o estabelecimento do limite superior (tabela 1).

Diante do exposto, a concentração de 2000 ng/mL foi proposta para o limite superior de quantificação para ambos os analitos nas matrizes em estudo, inclusive para o líquido e fluido seminal para os quais não havia informações na literatura científica. Assim, em um primeiro momento, a seguinte faixa de linearidade foi delineada para o estudo: 0,10 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL, 800 ng/mL, 1600 ng/mL e 2000 ng/mL. Vale apontar que, considerando a inexistência de informações sobre os níveis de sofosbuvir e GS-331007 em líquido e fluido seminal, os pontos da curva nessas matrizes foram os mesmos delineados para a matriz plasma.

Para terminar, durante a avaliação da curva de calibração, também foi investigado o fator de ponderação ( $\ln y$ ,  $\ln x$ ,  $1/y$ ,  $1/y^2$ ,  $1/x$  e  $1/x^2$ ) a ser aplicado nas curvas. Esse fator é uma ferramenta matemática capaz de corrigir a

heterocedasticidade dos resíduos, que é comum nas metodologias bioanalíticas (ANVISA, 2012; KADIAN et al., 2016).

### 3.3.10 Delineamento dos níveis de concentração dos controles de qualidade

O nível de concentração dos controles foi estabelecido segundo diretrizes da legislação da ANVISA (2012), conforme descrito a seguir:

- controle de qualidade baixo (CQB): concentração até 3 vezes o limite inferior de quantificação;
- controle de qualidade médio (CQM): concentração deve estar próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação;
- controle de qualidade alto (CQA): concentração entre 75 e 85 % do limite superior de quantificação;
- controle de qualidade de diluição (CQD): concentração maior do que o limite superior de quantificação.

Inicialmente, os controles propostos foram: 0,30 ng/mL (CQB), 1000 ng/mL (CQM), 1600 ng/mL (CQA) e 6400 ng/mL (CQD). Eles foram preparados pela fortificação da matriz biológica branca com soluções dos analitos de concentrações conhecidas, isto é, as soluções SQR.

## 3.4 Validação de metodologias bioanalíticas

Após a conclusão dos testes de desenvolvimento e investigação preliminar sobre importantes parâmetros das metodologias, iniciou-se a validação segundo diretrizes da legislação da ANVISA (2012) (Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012), que determina as exigências mínimas para validação de métodos bioanalíticos. Os seguintes ensaios devem ser realizados:

- seletividade;
- seletividade com potenciais interferentes;
- efeito de matriz;

- efeito de matriz com potenciais interferentes;
- contaminação cruzada ou arraste (*carry over*);
- linearidade;
- precisão e exatidão;
- diluição;
- estabilidade do analito em matriz biológica;
- estabilidade do analito e padrão interno em solução.

De modo geral, os requisitos da legislação vigente estão de acordo com o exigido por outras agências reguladoras pelo mundo e servem como referência para a condução de inúmeros trabalhos científicos (KADIAN et al., 2016).

#### 3.4.1 Seletividade

A resolução RDC n° 27 determina que a seletividade seja avaliada por meio da análise da matriz branca de diferentes fontes, isto é, a matriz de pessoas diferentes isenta de analito e padrão interno. Exige-se, no mínimo, a avaliação da matriz de 6 indivíduos diferentes para verificar o grau de interferência de componentes da matriz, que podem suprimir ou incrementar o sinal analítico.

Para conduzir a investigação da seletividade em plasma, foram analisadas amostras de branco obtidas de 6 indivíduos de acordo com as seguintes características:

- 4 brancos de matriz normal;
- 1 branco de matriz lipêmica;
- 1 branco de matriz hemolisada.

Para o líquor e fluido seminal, exige-se apenas que o branco da matriz de 6 indivíduos distintos seja examinado. Os resultados obtidos dos brancos foram comparados com amostras da menor concentração de trabalho, ou seja, limite inferior de quantificação (LIQ). A comparação consiste na razão entre a área no branco e a

área do analito e padrão interno no LIQ. Essa razão é denominada % interferência. Os seguintes critérios foram adotados para aprovação do ensaio:

- interferência no tempo de retenção do analito: até 20 % da área do LIQ;
- interferência no tempo de retenção do padrão interno: até 5 % da área do padrão interno.

#### *3.4.1.1 Seletividade na presença de potenciais interferentes*

A nicotina e a cafeína, que são comumente encontrados em matrizes biológicas de origem humana, foram avaliadas como interferentes potenciais das metodologias. Para tal, essas substâncias adicionadas nas amostras dos brancos de matriz por meio de uma solução SQR. Em seguida, os brancos foram extraídos e injetados no sistema LC-MS/MS, sendo comparados com amostras de limite inferior de quantificação. Os critérios de avaliação foram os mesmos descritos no ensaio convencional (seção 3.4.1).

#### *3.4.2 Efeito matriz*

Embora as curvas de calibração empregadas neste trabalho sejam confeccionadas na matriz em estudo, ensaios devem ser conduzidos para avaliar o grau de perturbação que os constituintes endógenos podem causar nas determinações. Assim sendo, o ensaio de efeito matriz deve ser realizado para examinar a interferência que os componentes da matriz branca (isenta do analito e padrão interno) podem causar na análise, tais como supressão ou aumento da resposta analítica.

De acordo com o guia, a avaliação do efeito matriz deve ser feita de forma quantitativa. Esse tipo de avaliação consiste na comparação da resposta analítica dos brancos de matriz fortificados com o analito e padrão interno após a extração (FD) com amostras contendo o analito e padrão interno preparadas em fase móvel (solução), ou seja, que não possuem os constituintes da matriz.

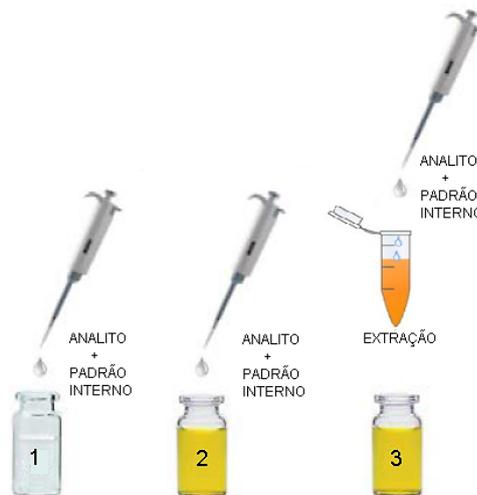
De forma mais específica, essa comparação consiste na razão entre a resposta analítica das amostras pós-extraídas (FD) e a resposta das amostras em fase móvel,

resultando em um número adimensional denominado fator matriz normalizado (FMN) por padrão interno (PI), que reflete o grau do efeito matriz. A fórmula a seguir mostra o cálculo do FMN:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Matriz biológica (Área do analito/Área do PI)}}{\text{Fase móvel (Área do analito/Área do PI)}}$$

A amostra pós-extraída (FD) é preparada pela extração da matriz branca e posterior adição do analito e padrão interno. Por outro lado, a amostra em solução é preparada pela diluição do analito e padrão interno em fase móvel em concentração equivalente à amostra FD. A figura 11 ilustra os diferentes tipos de amostras empregadas na validação de metodologias bioanalíticas, sendo utilizadas neste ensaio as amostras dos tipos 1 e 2.

Figura 11 - Tipos de amostra utilizadas na validação de métodos bioanalíticos



Legenda: 1 - amostra em fase móvel; 2 - amostra pós-extraída (FD); 3 - amostra fortificada antes da extração.

Fonte: Adaptado de (CORTESE et al., 2020).

Para conduzir a investigação do efeito matriz em plasma, o guia estabelece que a matriz branca de 8 indivíduos (8 origens diferentes) seja investigada. Os brancos utilizados no ensaio devem apresentar as seguintes características:

- 4 brancos de plasma normal;
- 2 brancos de plasma lipêmico;

- 2 brancos de plasma hemolisado.

Para o líquor e fluido seminal, é exigido apenas que a matriz branca de 6 origens distintas seja avaliada.

Mais precisamente, neste ensaio, a matriz branca dos diferentes indivíduos foi extraída e então adicionada de uma solução do analito e padrão interno para formar amostras pós-extraídas (FD) de controle de qualidade baixo (CQB) e alto (CQA). Em paralelo, foram preparadas amostras em solução em concentração equivalente às amostras FD, isto é, CQB e CQA em fase móvel. Em seguida, para cada amostra FD, foi calculado o FMN, que foi utilizado para avaliação do efeito matriz.

O coeficiente de variação (CV) dos FMN foi utilizado como critério de aprovação do ensaio, sendo considerado aprovado quando:

- CV dos FMN menor do que 15 % para cada concentração (CQB e CQA).

#### 3.4.2.1 Efeito de matriz com potenciais interferentes

Este ensaio foi conduzido de forma similar ao ensaio convencional (seção 3.4.2), exceto pela adição dos potenciais interferentes nicotina e cafeína nas amostras pós-extraídas. O critério de aprovação também foi o coeficiente de variação dos FMN.

#### 3.4.3 Contaminação cruzada ou arraste

O ensaio para avaliação do arraste (*carry over*) objetiva examinar a contaminação de uma injeção na amostra subsequente, isto é, a contaminação cruzada entre as injeções. A resolução RDC n° 27 determina que um branco da matriz seja injetado, no mínimo, três vezes, sendo uma injeção antes e as outras duas imediatamente após a amostra de maior concentração da curva de calibração (limite superior de quantificação - LSQ).

No presente ensaio, a corrida analítica para verificação da contaminação cruzada foi realizada conforme ordem apresentada a seguir:

- primeira injeção: branco da matriz (1º Branco);

- segunda injeção: limite inferior de quantificação (LIQ);
- terceira injeção: limite superior de quantificação (LSQ);
- quarta injeção: branco da matriz novamente (2º Branco);
- quinta injeção: branco da matriz novamente (3º Branco).

O sinal cromatográfico do branco injetado após o LSQ foi comparado com o sinal do LIQ a fim de avaliar a presença e o grau de contaminação entre as injeções, isto é, o % arraste (área do branco/área do LIQ). A resposta cromatográfica no 2º branco e 3º branco deve atender às seguintes condições para aprovação do ensaio, isto é, ausência de arraste:

- analito: arraste inferior a 20 % da área do LIQ;
- padrão interno: arraste inferior a 5 % da área do padrão interno.

#### 3.4.4 Linearidade

A resolução da ANVISA (2012) determina que sejam avaliadas, no mínimo, 3 curvas de calibração com 6 pontos de diferentes concentrações. Então, três curvas foram confeccionadas utilizando-se as matrizes biológicas em estudo segundo procedimento de fortificação descrito em 3.3.9. O seguinte critério foi adotado para avaliação:

- coeficiente de correlação ( $r$ ) maior ou igual a 0,99.

A propósito, o coeficiente de correlação ( $r$ ) ou determinação ( $R^2$ ), é frequentemente utilizado como critério para avaliação da linearidade nas metodologias bioanalíticas (ANVISA, 2012; KADIAN et al., 2016).

Além disso, os pontos da curva de calibração precisam obedecer aos seguintes critérios para serem considerados aprovados:

- LIQ: exatidão entre 80 e 120 %;

- demais níveis: exatidão entre 85 e 115 %.

#### 3.4.5 Precisão e exatidão

A resolução RDC nº 27 determina que a precisão e a exatidão sejam avaliadas em uma mesma corrida e em, no mínimo, três corridas em dias diferentes. Determina ainda que sejam preparadas pelo menos 5 replicatas de cada nível de concentração: CQB (controle de qualidade de baixa concentração), CQM (controle de qualidade média concentração) e CQA (controle de qualidade de alta concentração). Os ensaios foram conduzidos conforme determinado pela legislação e as seguintes especificações foram adotadas:

- CV menor ou igual a 15 % e exatidão entre 85 e 115 %.

#### 3.4.6 Diluição

A resolução RDC nº 27 determina que o processo para diluição seja avaliado pela análise de, no mínimo, 5 replicatas de controles de qualidade de diluição (CQD), pois não é admitida a extrapolação de resultados além do limite superior de quantificação. Os ensaios foram conduzidos de forma similar ao descrito em 3.4.5 e as seguintes especificações foram adotadas:

- CV menor ou igual a 15 % e exatidão entre 85 e 115 %.

#### 3.4.7 Estabilidade dos analitos em matriz biológica

A investigação da estabilidade dos analitos em matriz visa detectar uma possível degradação nos fluidos biológicos. Segundo a legislação (ANVISA, 2012) a avaliação da estabilidade em matriz deve contemplar a análise de, pelo menos, 3 replicatas de controles de qualidade de baixa e alta concentração. Os controles submetidos às condições de estabilidade devem obedecer à seguinte especificação:

- desvio em relação ao valor nominal de até 15 %.

Os seguintes ensaios de estabilidade foram realizados:

- estabilidade de curta duração;
- estabilidade pós-extração (pós-processamento);
- estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento;
- estabilidade de longa duração.

#### *3.4.7.1 Estabilidade de curta duração*

Compreende a investigação da estabilidade em curto período e em temperatura ambiente. No presente ensaio, as replicatas foram deixadas sobre a bancada do laboratório ( $22 \pm 2$  °C) por determinado tempo e então foram analisadas.

#### *3.4.7.2 Estabilidade pós-extração (pós-processamento)*

Compreende a investigação da estabilidade das replicatas extraídas e deixadas no autoinjeter do equipamento. Essa avaliação é necessária porque após o procedimento de extração a amostra permanece no autoinjeter até ser injetada no sistema LC-MS/MS.

#### *3.4.7.3 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento*

Compreende a investigação da estabilidade das replicatas após ciclos de congelamento e descongelamento. Neste ensaio, as replicatas dos controles de qualidade foram submetidas a ciclos de congelamento (*freezer* -70 °C) e descongelamento (22 °C) e então foram analisadas.

#### *3.4.7.4 Estabilidade de longa duração*

Compreende a investigação da estabilidade por longo período na temperatura de armazenamento. No presente ensaio, as replicatas dos controles de qualidade foram deixadas em *freezer* -70 °C ( $\pm 15$  °C) por determinado período e então foram analisadas.

### 3.4.8 Estabilidade dos analitos e padrões internos em solução

A integridade das soluções padrão dos analitos e padrão interno foi examinada por meio de ensaios realizados em duas condições distintas:

- estabilidade de curta duração (em bancada:  $22 \pm 2$  °C);
- estabilidade de armazenamento (em *freezer*:  $-70 \pm 15$  °C).

A Resolução RDC nº 27 determina que, no mínimo, 3 amostras das soluções padrão sejam avaliadas. Foram examinadas as soluções de maior (solução estoque) e menor concentração do analito e padrão interno.

Assim, no caso dos analitos, foram examinadas a solução estoque e a solução do limite inferior de quantificação, ao passo que, no caso dos padrões internos, as soluções avaliadas foram a estoque (maior concentração) e a solução de uso (menor concentração).

As amostras submetidas às condições de estabilidade (amostras teste) foram comparadas com as amostras recém-preparadas. A área média das amostras teste foi comparada com a área média das amostras recém-preparadas. Neste ensaio, foram avaliadas 8 amostras de cada nível testado. Para considerar a solução estável, o guia da ANVISA estabelece a seguinte condição:

- desvio de até 10 % entre a média da área das amostras teste e recém-preparadas.

A estabilidade das soluções dos potenciais interferentes (nicotina e cafeína) não foi avaliada porque essas soluções não foram armazenadas e a utilização ocorreu imediatamente após o preparo.

## 3.5 Ensaio clínico piloto com foco em Zika

O centro clínico Scentryphar Pesquisa Clínica Ltda foi responsável pela condução do ensaio clínico. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Jaguariúna, São Paulo, sob o número CAEE

70895717.8.0000.5409 (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) e foi realizado em duas etapas independentes, de acordo com as diretrizes nacionais e internacionais relacionadas aos ensaios com humanos.

Apenas indivíduos sadios foram selecionados para participação no estudo, sendo os critérios de seleção previamente definidos no protocolo clínico. Tendo em vista o objetivo do estudo, que é a realização de uma avaliação piloto, somente 12 participantes foram incluídos na pesquisa.

Os indivíduos receberam, em jejum, um comprimido do medicamento (Sovaldi®) contendo 400 mg de sofosbuvir. Em seguida, tiveram amostras de sangue, líquido e fluido seminal coletadas 1h:30 min e 5h:00 min após a administração do medicamento. A propósito, os pontos de coleta foram previamente selecionados pelo Scentryphar, pois, de acordo com os dados farmacocinéticos do sofosbuvir e de GS-331007 (tabela 1), correspondem aos picos de concentração plasmática ( $C_{max}$ ) de sofosbuvir e GS-331007.

As coletas foram realizadas em unidade de internação hospitalar, sendo executada/orientada por profissionais de saúde devidamente habilitados. O sangue foi coletado em tubos contendo EDTA K3 e o plasma sanguíneo foi obtido após a centrifugação (1000 g por 10 min em 4 °C), sendo acondicionado em tubo criogênico. O líquido foi coletado por punção lombar com o auxílio de seringa e agulha apropriada, sendo, em seguida, centrifugado e acondicionado em tubo criogênico. Por fim, o fluido seminal foi coletado apenas pelos homens em recipiente plástico (frasco de coleta de urina) por masturbação, sendo centrifugado e acondicionado em tubo criogênico. Visando garantir um maior volume ejaculado, os doadores de fluido seminal foram orientados a não praticar relações sexuais 72 h antes do estudo. As amostras coletadas foram armazenadas em *freezer* -70 °C até o momento da análise.

Os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A) e foram orientados sobre os riscos e benefícios bem como sobre o direito de abandonar a pesquisa a qualquer momento.

### 3.5.1 Primeira etapa - Penetração no SNC

Objetivando avaliar a penetração de sofosbuvir e seu principal metabólito (GS-331007) no Sistema Nervoso Central, foram coletadas amostras concomitantes de sangue e líquido após a administração de um comprimido de 400 mg de sofosbuvir.

Todos os participantes do Estudo foram incluídos nessa fase, sendo 8 homens e 4 mulheres. As coletas foram realizadas da seguinte maneira:

- 1h:30 min: 8 homens para coleta de sangue e líquido;
- 1h:30 min: 4 mulheres para coleta de sangue e líquido;
- 5h:00 min: 8 homens para coleta de sangue e líquido;
- 5h:00 min: 4 mulheres para coleta de sangue e líquido.

No total, 48 amostras clínicas foram coletadas, sendo 24 de sangue e 24 de líquido. Para cada amostra analisada, foi calculada a razão entre a concentração em líquido e a concentração em plasma (razão líquido/plasma), que é tanto maior quanto maior for a penetração da substância no sistema nervoso central.

### 3.5.2 Segunda etapa - Penetração no sistema reprodutivo masculino

Objetivando avaliar a penetração de sofosbuvir e GS-331007 no Sistema reprodutivo masculino, amostras de sangue e fluido seminal foram coletadas após a administração única de 400 mg de sofosbuvir. Dessa maneira, apenas 8 homens foram incluídos nesta etapa. A fim de garantir completa eliminação de sofosbuvir e GS-331007 do organismo dos indivíduos, ela foi realizada 2 semanas após a primeira. Além disso, com o objetivo de viabilizar a coleta do fluido seminal, os homens foram divididos em dois grupos e as coletas ocorreram de acordo com o descrito a seguir:

- 1h:30 min: 4 homens para coleta de sangue e fluido seminal;
- 5h:00 min: 4 homens para coleta de sangue e fluido seminal.

Nesta etapa, 16 amostras clínicas foram coletadas, sendo 8 amostras de sangue e 8 amostras de fluido seminal. Para cada amostra analisada, foi calculada a

razão entre a concentração em fluido seminal e a concentração em plasma (razão fluido seminal/plasma), que é tanto maior quanto maior for a penetração da substância no sistema reprodutivo masculino.

### 3.5.3 Quantificação das amostras clínicas

Após desenvolvimento e validação, as metodologias bioanalíticas foram aplicadas na análise das amostras reais proveniente do ensaio clínico. Em cada corrida analítica foram incluídos controles de qualidade, os quais foram utilizados como critério de aprovação. Além disso, apenas as amostras clínicas de concentração entre o LIQ e o LSQ foram quantificadas. As amostras que apresentaram concentração abaixo do LIQ foram reportadas como < LIQ, enquanto as amostras de concentração superior ao LSQ foram diluídas e reanalisadas. A partir dos resultados obtidos, foi possível avaliar a penetração de sofosbuvir e GS-331007 no sistema nervoso central de homens e mulheres saudáveis e reprodutivo masculino de homens saudáveis.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Desenvolvimento de metodologias bioanalíticas

Após levantamento na literatura, foram obtidas informações sobre a determinação de sofosbuvir e GS-331007 em matrizes biológicas. Além disso, também foram coletados dados sobre os analitos, candidatos a padrão interno (cimetidina, zidovudina e diazepam) e potenciais interferentes (nicotina e cafeína) conforme apresentado na tabela 7.

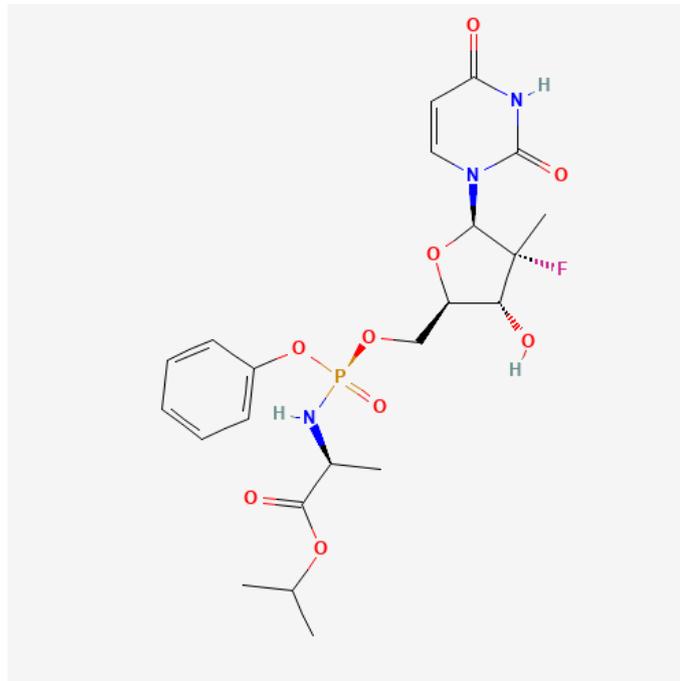
Tabela 7 - Dados dos analitos, padrões internos e potenciais interferentes

Substância	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Massa monoisotópica (Da)
Sofosbuvir	$C_{22}H_{29}FN_3O_9P$	529,46	529,16
GS-331007	$C_{10}H_{13}FN_2O_5$	260,22	260,08
Cimetidina	$C_{10}H_{16}N_6S$	252,34	252,12
Zidovudina	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	267,24	267,10
Diazepam	$C_{16}H_{13}ClN_2O$	284,74	284,07
Nicotina	$C_{10}H_{14}N_2$	162,23	162,12
Cafeína	$C_8H_{10}N_4O_2$	194,19	194,08

Fonte: (PUBCHEM, 2022a; 2022b; 2022c; 2022d; 2022e; 2022f; 2022g)

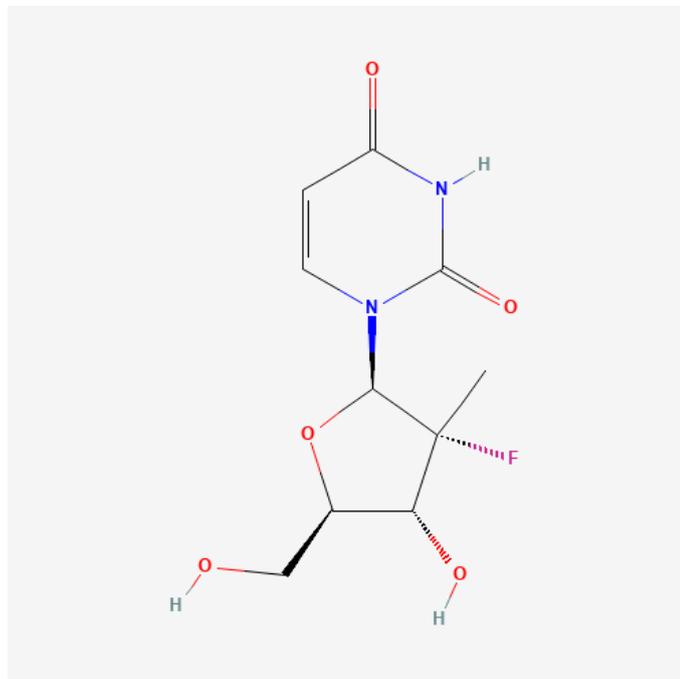
A cimetidina, zidovudina e diazepam foram selecionados como candidatos a padrão interno com base nas publicações consultadas. As figuras 12 a 19 a seguir apresentam as fórmulas estruturais das substâncias supramencionadas, além da fórmula estrutural da famotidina (análogo da cimetidina).

Figura 12 - Fórmula estrutural do sofosbuvir



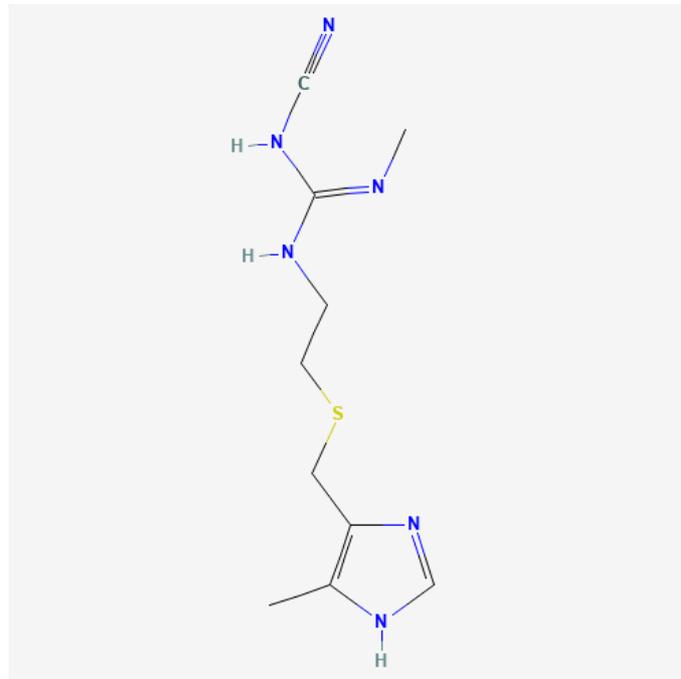
(PUBCHEM, 2022a)

Figura 13 - Fórmula estrutural do metabólito GS-331007



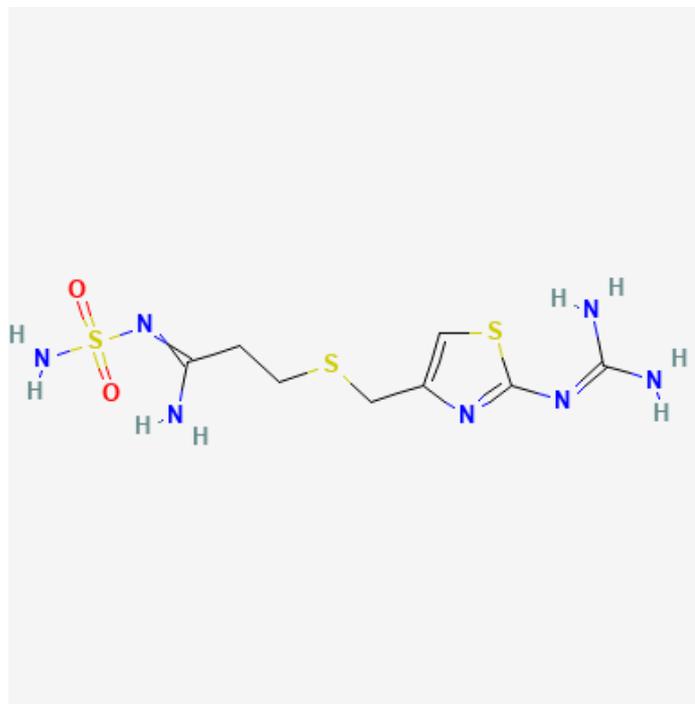
(PUBCHEM, 2022b)

Figura 14 - Fórmula estrutural da cimetidina



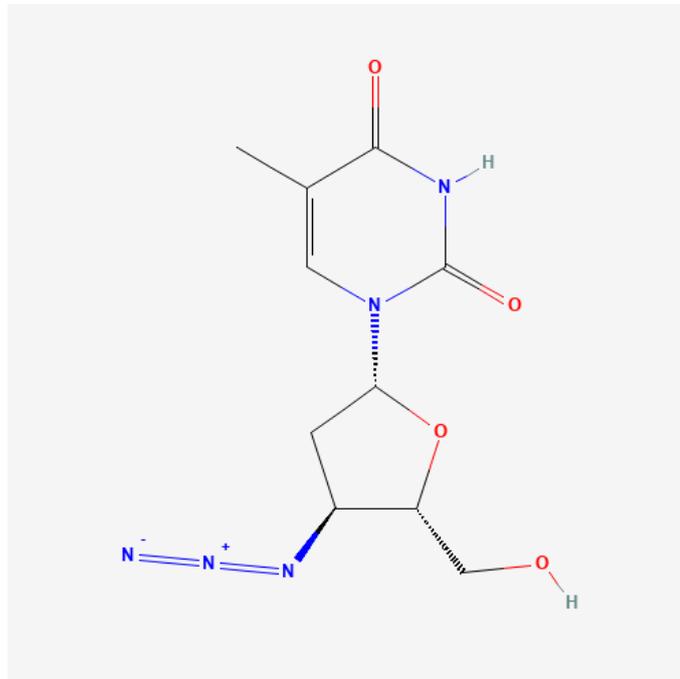
(PUBCHEM, 2022c)

Figura 15 - Fórmula estrutural da famotidina



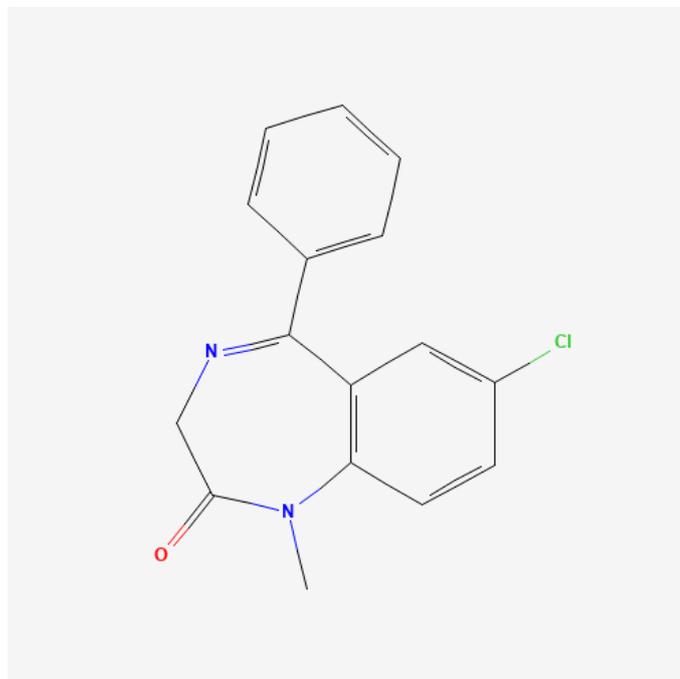
(PUBCHEM, 2022h)

Figura 16 - Fórmula estrutural da zidovudina



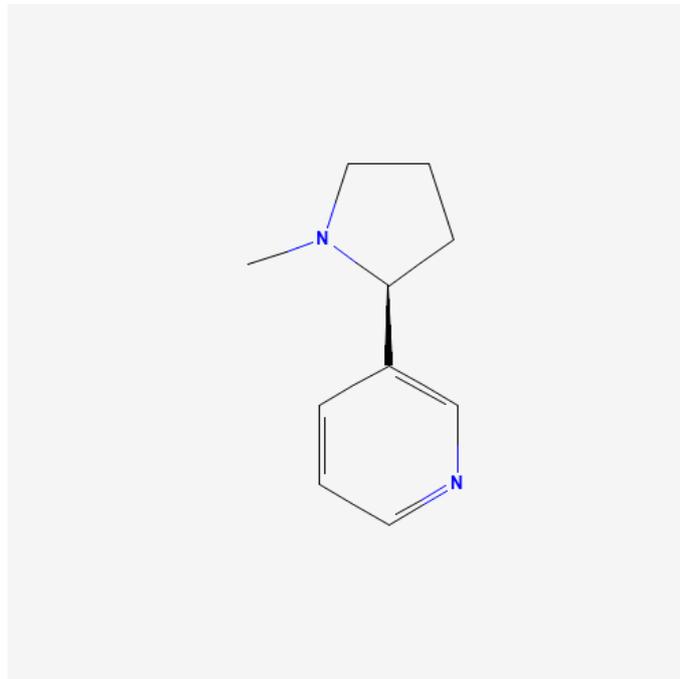
(PUBCHEM, 2022d)

Figura 17 - Fórmula estrutural do diazepam



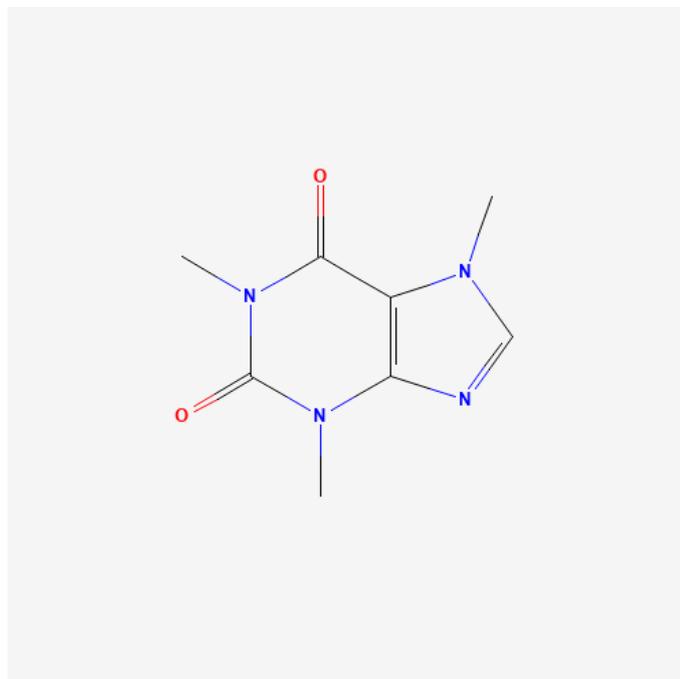
(PUBCHEM, 2022e)

Figura 18 - Fórmula estrutural da nicotina



(PUBCHEM, 2022f)

Figura 19 - Fórmula estrutural da cafeína



(PUBCHEM, 2022g)

O levantamento realizado confirmou que a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial é a principal ferramenta analítica para determinação de sofobuvir e GS-331007 em matrizes biológicas. Especialmente em

relação à quantificação na matriz plasma humano, diversas publicações sobre o tema serviram de base para o desenvolvimento das metodologias propostas (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; ARIAUDO et al., 2016; ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017; NOTARI et al., 2018; SEMREEN et al., 2019; SEYEN et al., 2019; FERRARI et al., 2019; SHEN et al., 2019). Além disso, serviram como embasamento adicional, os estudos que abrangem a quantificação simultânea de sofobuvir e GS-331007 em matrizes de origem animal (SHI et al., 2015; PAN et al., 2016; GARDINALI et al., 2020). Em contrapartida, em relação às determinações em líquido e fluido seminal, não havia publicações sobre o assunto, o que tornou o presente trabalho ainda mais desafiador.

Uma vez levantadas as informações iniciais necessárias, o próximo passo foi preparar as soluções das substâncias químicas de referência dos analitos, candidatos a padrão interno e potenciais interferentes para então iniciar as investigações necessárias.

#### 4.1.1 Soluções SQR's dos analitos (sofobuvir e GS-331007)

A combinação dos solventes metanol e água apresentou os melhores resultados para o preparo das soluções de sofobuvir e GS-331007, estando em conformidade com a maior parte das publicações sobre o tema (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; SHI et al., 2015; PAN et al., 2016; ARIAUDO et al., 2016; ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017; NOTARI et al., 2018; SEMREEN et al., 2019).

Para a diluição da SQR, foi utilizada a solução de composta por metanol e água na proporção 80:20 (v/v). Para a diluição das soluções de trabalho, foi utilizada a solução de metanol e água 50:50 (v/v). O procedimento de preparo dessas soluções encontra-se descrito em 3.3.1. As soluções mostraram-se estáveis dentro do período de uso (5 dias). A confirmação de sua estabilidade foi realizada posteriormente por meio de ensaio de validação.

#### 4.1.2 Soluções dos candidatos a padrão interno

Foram selecionadas como candidatos a padrão interno as substâncias cimetidina, zidovudina e diazepam com base em publicações científicas sobre a

determinação de sofosbuvir e GS-331007 em matrizes biológicas (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; PAN et al., 2016; GARDINALI et al., 2020).

A seleção do melhor padrão interno na análise de cada matriz biológica foi realizada no decurso do desenvolvimento das metodologias considerando-se os resultados de precisão e exatidão obtidos após a análise de amostras de controle de qualidade. Dessa maneira, para a quantificação simultânea de sofosbuvir e GS-331007 em plasma humano, a cimetidina apresentou o melhor resultado, sendo selecionada como padrão interno. Ao contrário, a zidovudina foi selecionada como padrão interno para o líquor e o diazepam para a matriz fluido seminal.

Nesse cenário, é possível inferir que as peculiaridades de cada matriz conduziram ao resultado observado, visto que seus constituintes podem provocar diferentes graus de supressão na ionização e, com isso, interferir nas análises (RAPOLD, 2018). O sangue e o plasma, por exemplo, possuem alta concentração de fosfolípidios e ftalatos. Em contrapartida, o líquor possui alta concentração de íons, sobretudo os íons magnésio e cloro. Por fim, o fluido seminal possui alta concentração de íons bicarbonato e íons inorgânicos, que, aliás, são responsáveis por sua alta capacidade tamponante (COMAR et al., 2009; ZHOU et al., 2015; RAPOLD, 2018).

As soluções SQR de cimetidina, zidovudina e diazepam foram preparadas com os mesmos solventes empregados na diluição dos analitos, ou seja, metanol:água (80:20 v/v) para a solução estoque e metanol:água (50:50 v/v) para a solução de trabalho. Elas apresentaram estabilidade adequada dentro do período de uso (5 dias) e a confirmação do período de estabilidade foi realizada durante a validação.

#### 4.1.3 Soluções dos potenciais interferentes (nicotina e cafeína)

Apenas a nicotina e a cafeína foram avaliadas como potenciais interferentes, pois não houve administração de medicamento concomitante durante o estudo. Dessa maneira, soluções dessas substâncias foram preparadas com os mesmos diluentes dos analitos e padrões internos, isto é, metanol:água (80:20 v/v) para a solução estoque e metanol:água (50:50 v/v) para a solução de trabalho. Essas soluções foram descartadas logo após a utilização e, por esse motivo, não foram avaliadas quanto à estabilidade.

#### 4.1.4 Parâmetros Espectrômetro de massas

##### 4.1.4.1 Infusão direta

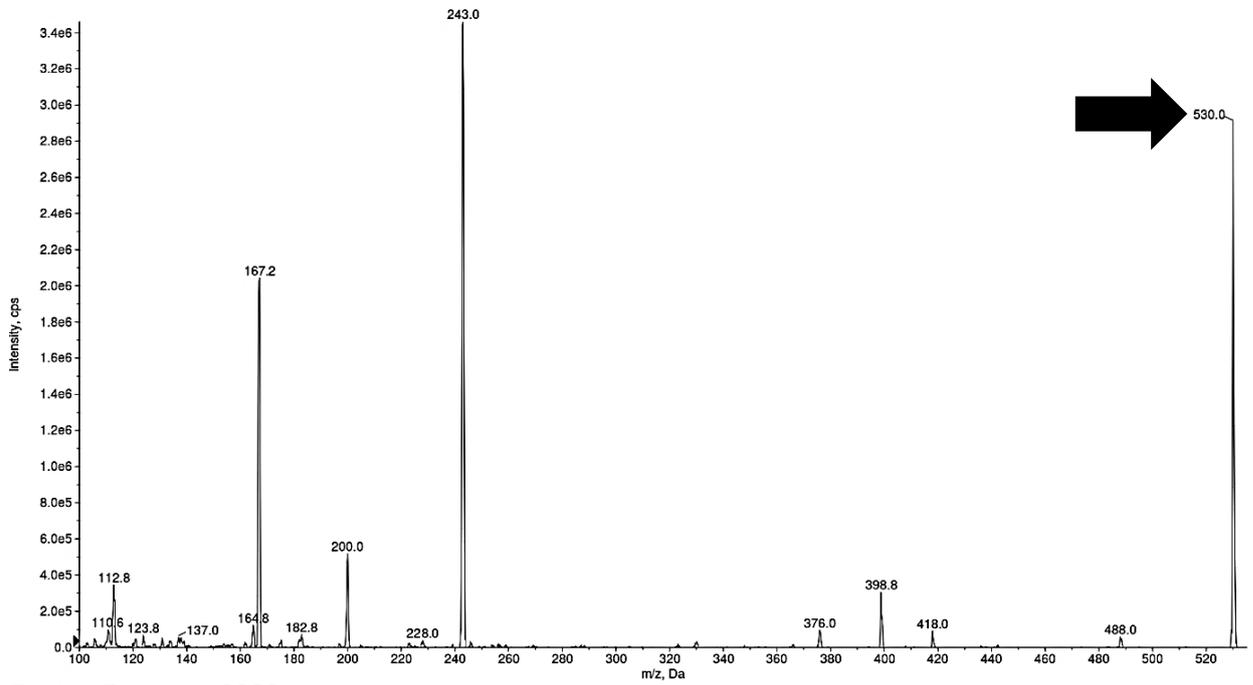
A primeira etapa do trabalho objetivou estabelecer parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas. Para tal, as soluções dos analitos e candidatos a padrão interno na concentração de 50 ng/mL foram introduzidas no espectrômetro por meio do procedimento Infusão direta. Vale mencionar que é fundamental que se mantenha a temperatura do laboratório estável a fim de impedir flutuações que podem prejudicar as análises.

Inicialmente, a Infusão direta foi realizada em modo negativo. Porém, o sinal obtido apresentou baixa intensidade e, por esse motivo, esse modo de operação não foi prosseguido. Em seguida, adicionou-se ácido fórmico na concentração de 0,1 % (v/v) nas soluções e o procedimento foi realizado em modo positivo.

O ácido contribuiu para a protonação das moléculas infundidas, promovendo a formação de íons carregados positivamente, que, então, são detectados. Por consequência, obteve-se um sinal mais intenso, o que levou ao emprego do modo positivo, convergindo plenamente com trabalhos científicos sobre o tema (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; SHI et al., 2015; ARIAUDO et al., 2016; PAN et al., 2016; ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017; NOTARI et al., 2018; FERRARI et al., 2019; SEMREEN et al., 2019; SEYEN et al., 2019; SHEN et al., 2019; GARDINALI et al., 2020). A única exceção ao resultado obtido é o estudo de Ariaudo e colaboradores (2016) no qual a análise de GS-331007 ocorreu em modo negativo.

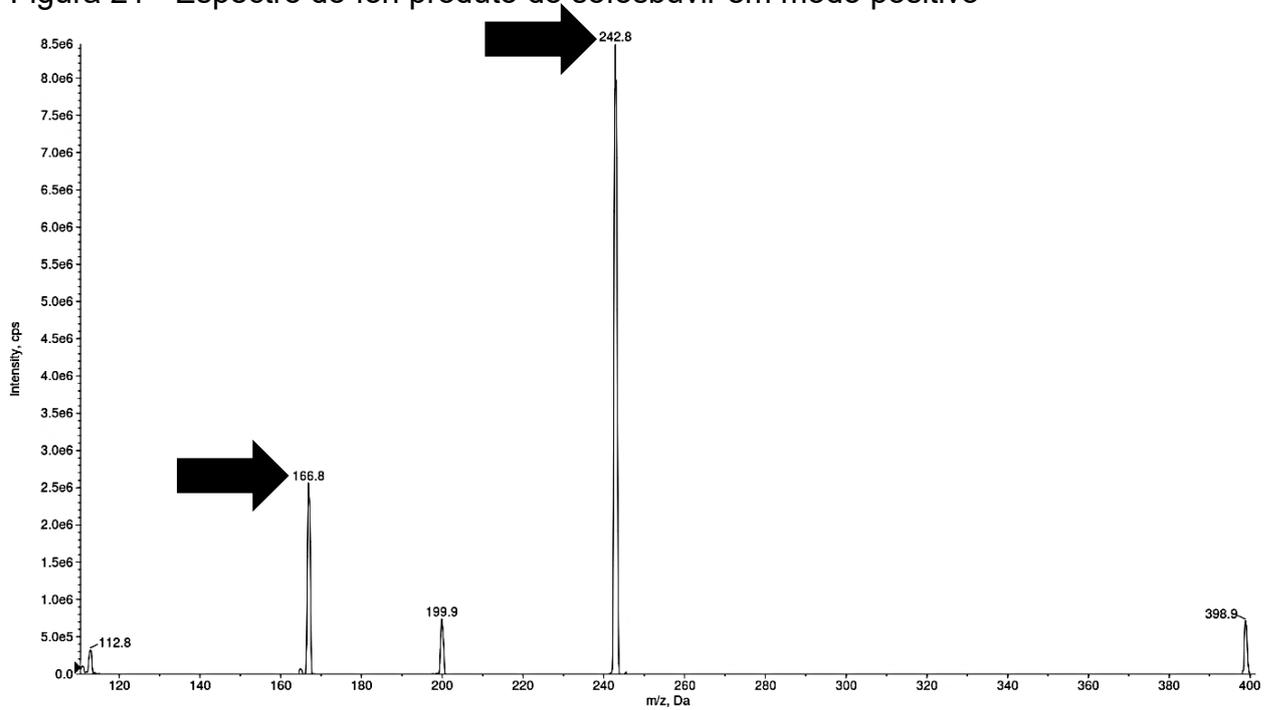
As figuras 20 a 29 (espectros de massas) a seguir apresentam os resultados obtidos em modo positivo de ionização. Cabe mencionar que as setas indicam o íon precursor e os íons produto selecionados para a análise, sendo o íon produto mais intenso utilizado para quantificação e o segundo mais intenso para qualificação/confirmação. A cimetidina é a única exceção ao anteriormente mencionado, sendo o segundo íon mais intenso (relação  $m/z$  116,9) escolhido para quantificação. A razão dessa escolha é justificada pelos resultados dos testes realizados com a matriz biológica, uma vez que exibiu menor variação quando comparado ao íon mais intenso ( $m/z$  158,8).

Figura 20 - Espectro do íon precursor do sofosbuvir em modo positivo



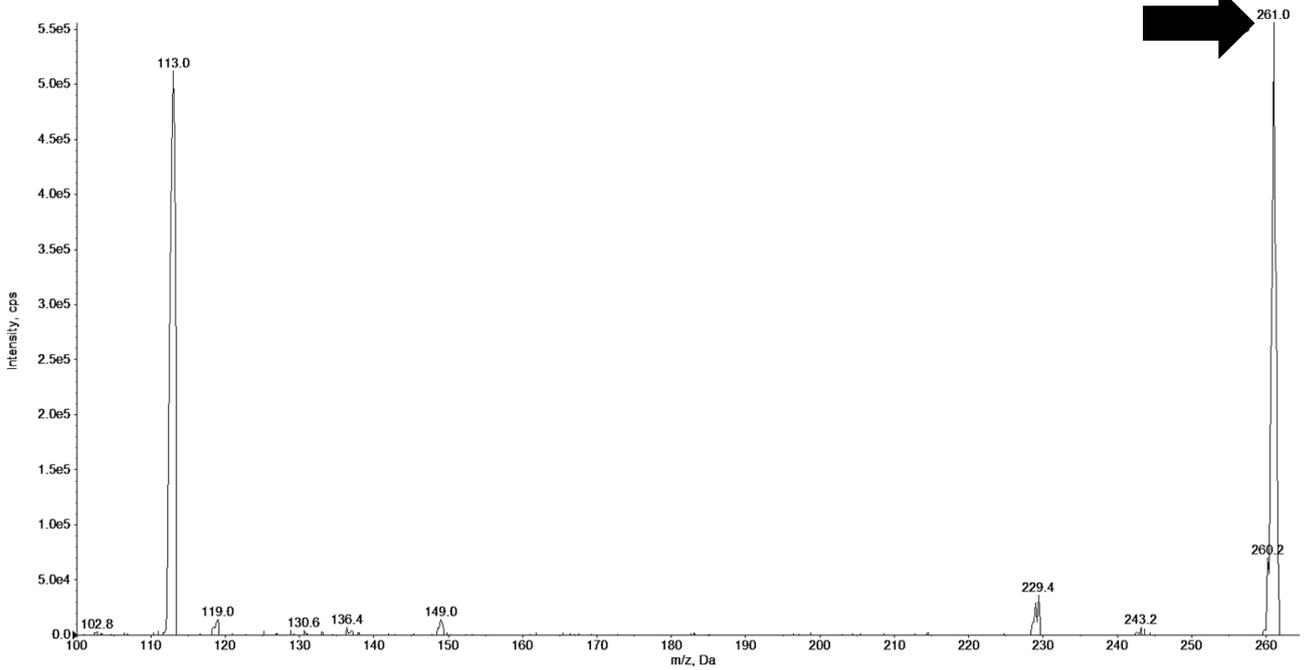
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 21 - Espectro do íon produto do sofosbuvir em modo positivo



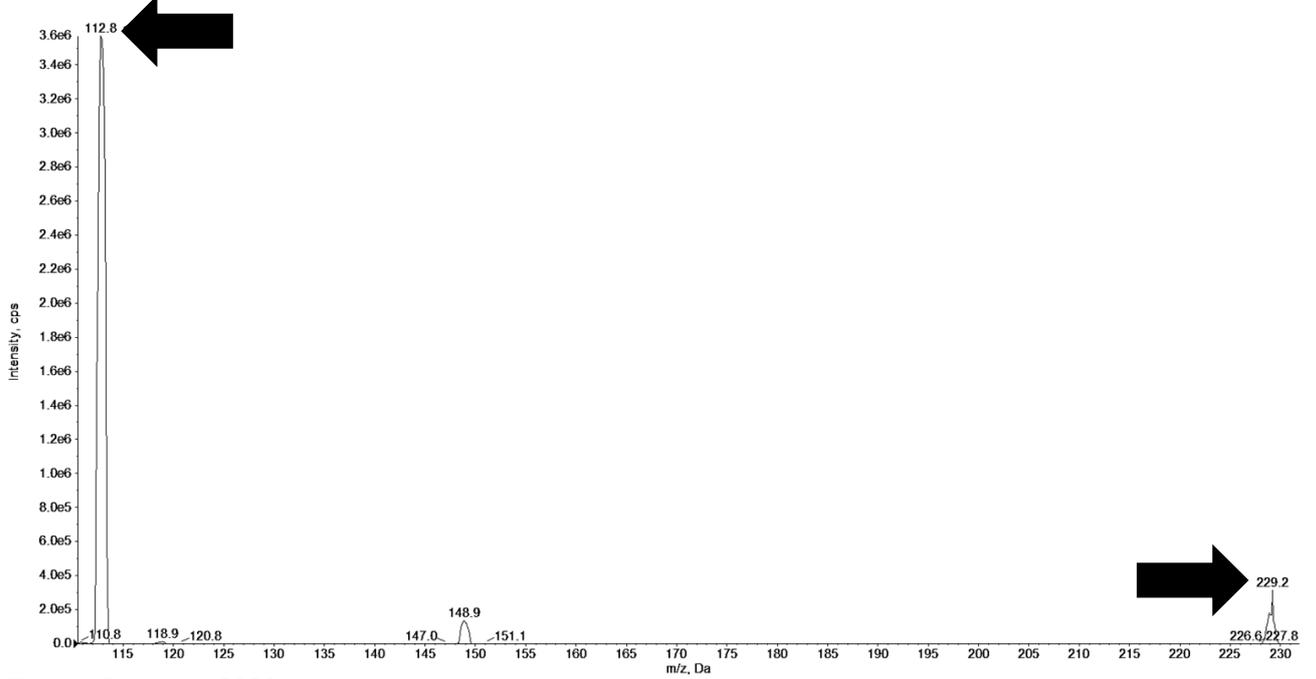
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 22 - Espectro do íon precursor do GS-331007 em modo positivo



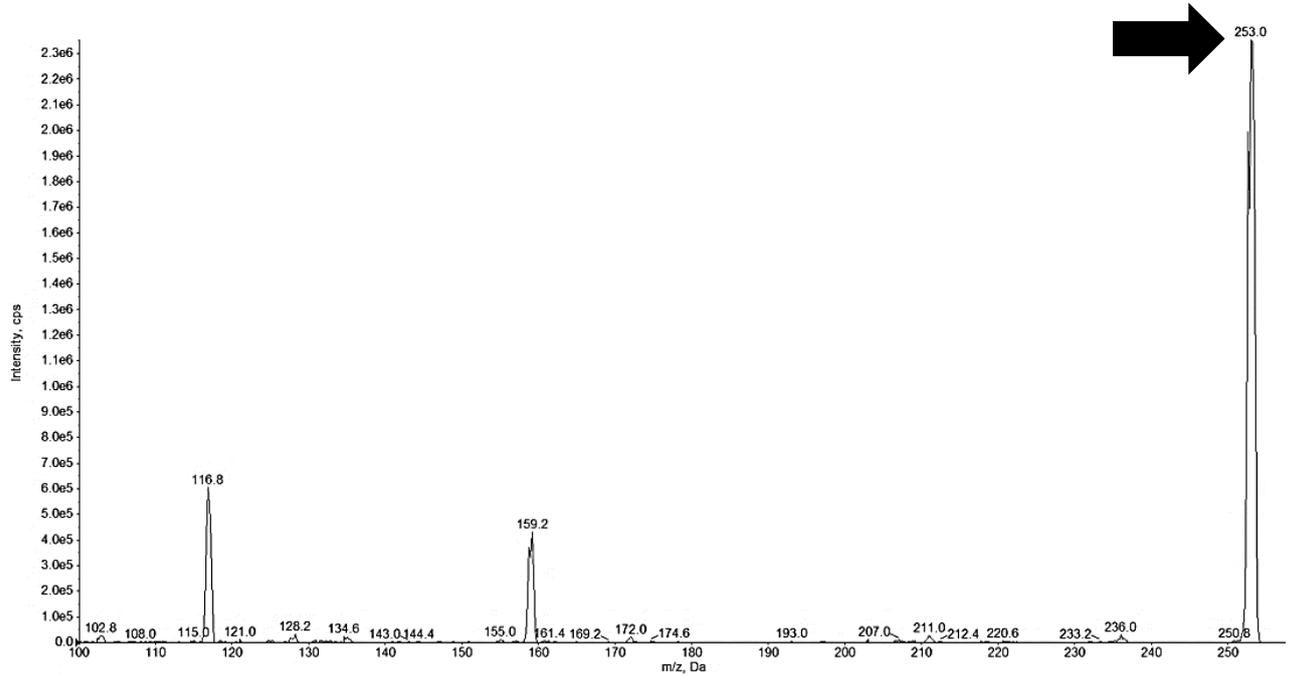
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 23 - Espectro do íon produto do GS-331007 em modo positivo



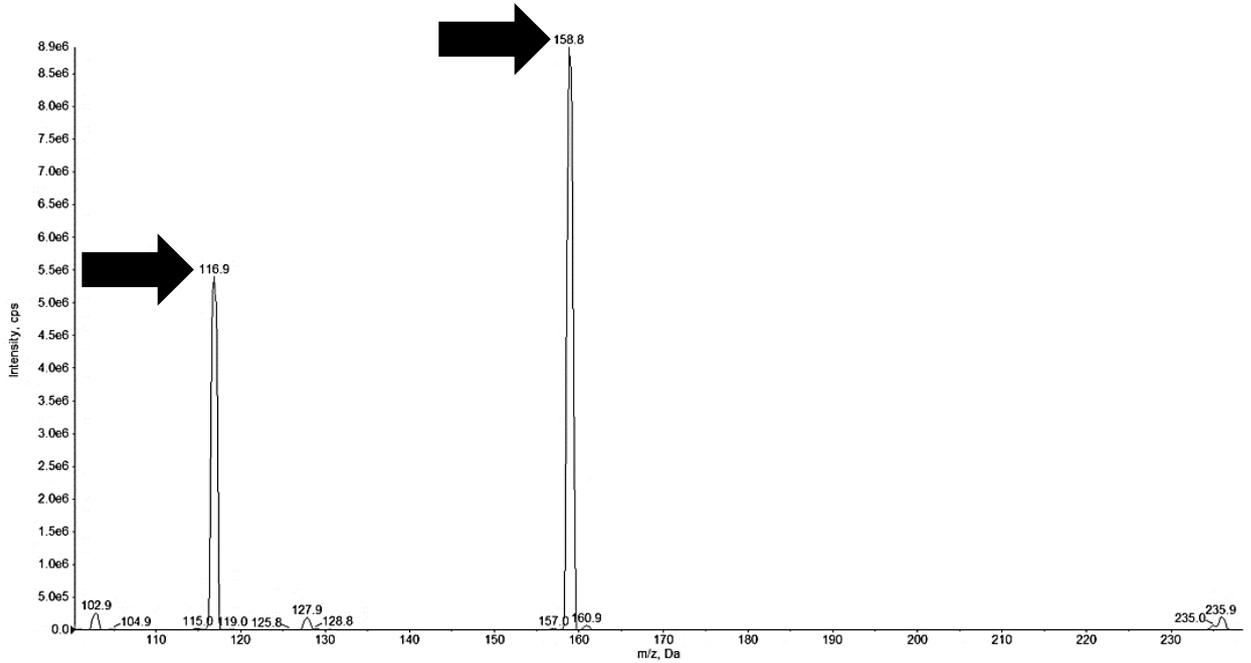
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 24 - Espectro do íon precursor da cimetidina em modo positivo



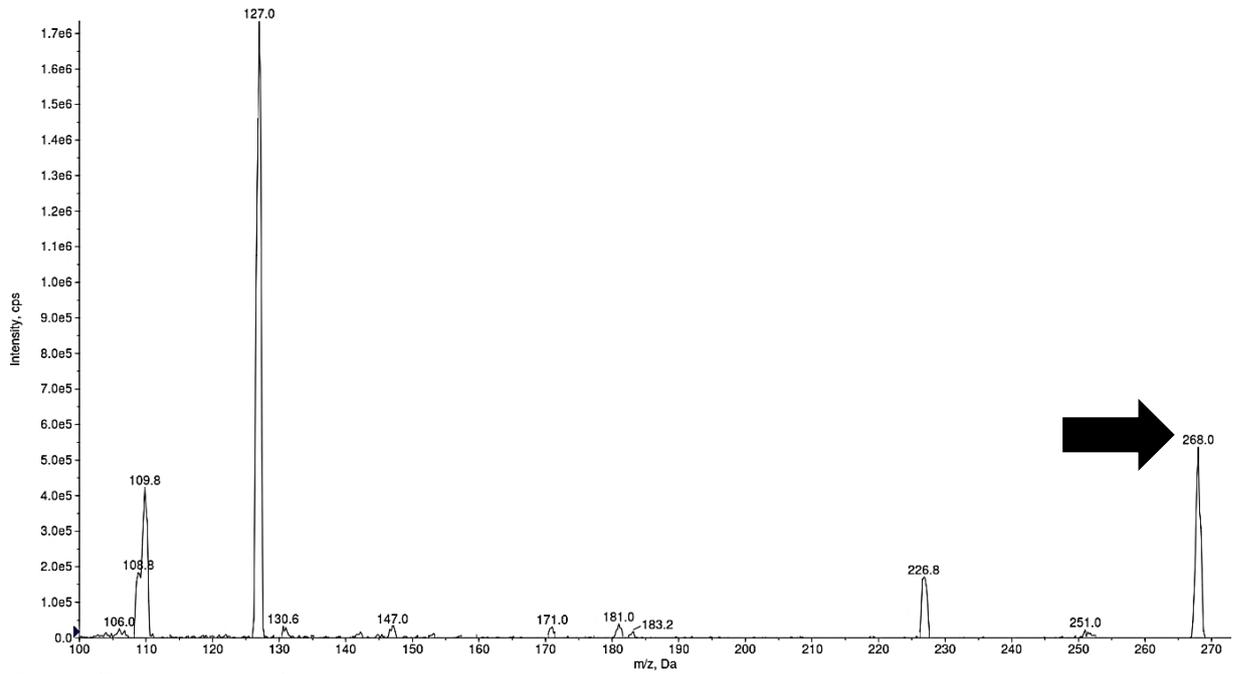
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 25 - Espectro do íon produto da cimetidina em modo positivo



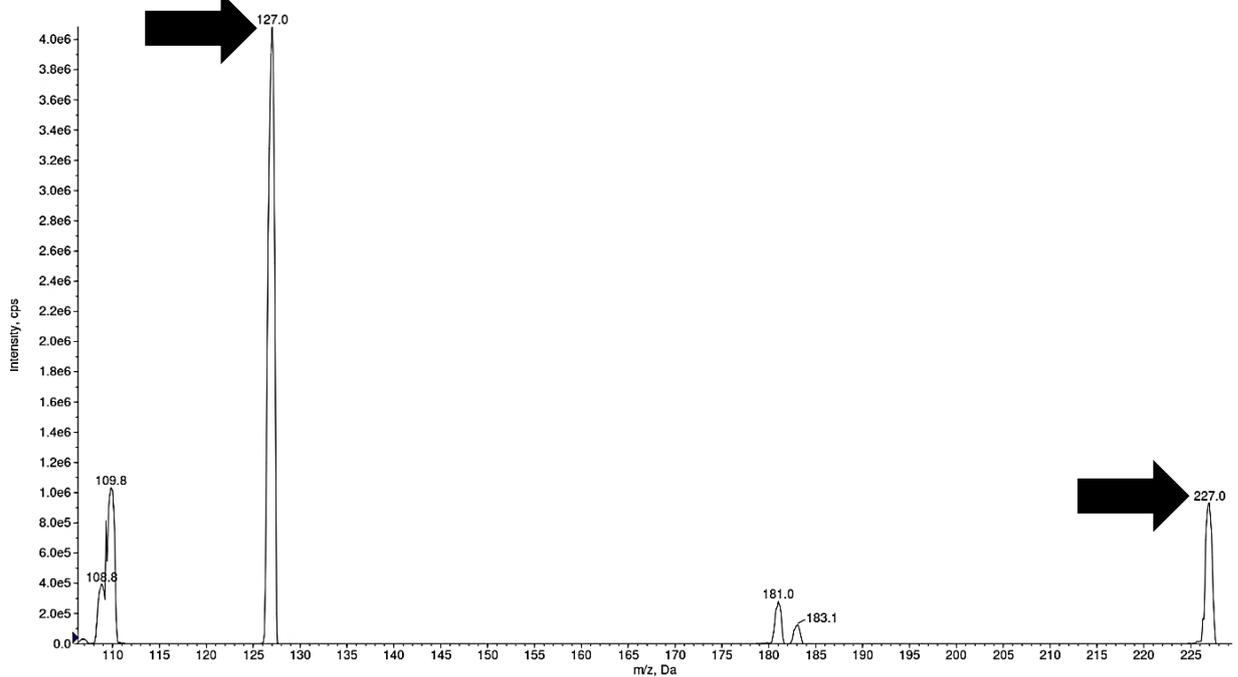
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 26 - Espectro do íon precursor da zidovudina em modo positivo



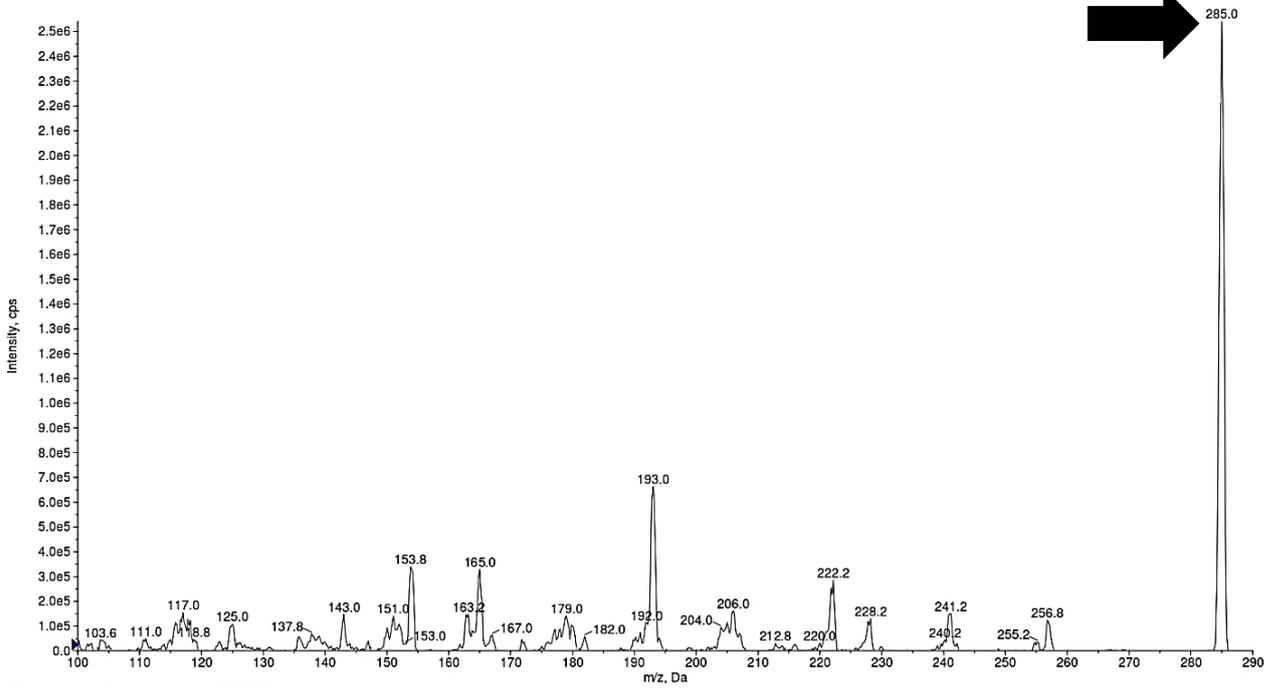
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 27 - Espectro do íon produto da zidovudina em modo positivo



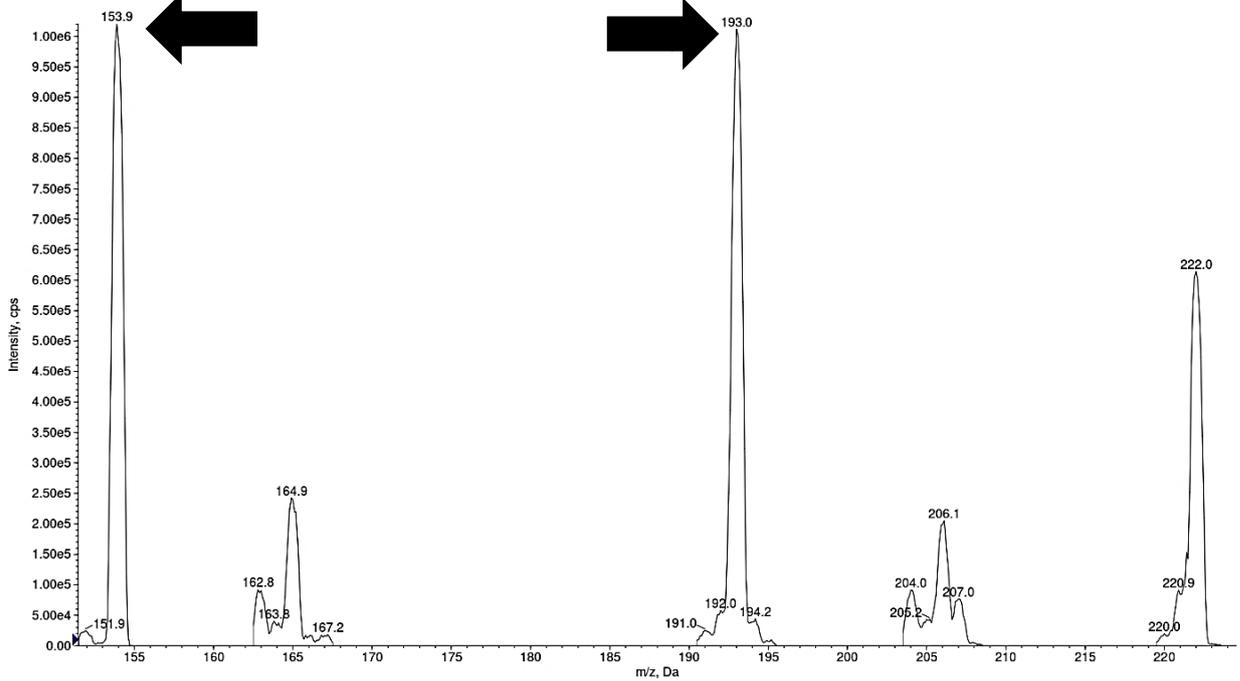
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 28 - Espectro do íon precursor do diazepam em modo positivo



Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 29 - Espectro do íon produto do diazepam em modo positivo



Fonte: (Do autor, 2022).

Observa-se que a transição íon precursor>íon produto selecionada para quantificação dos analitos está em consonância com estudos prévios, conforme apresentado a seguir:

- **sofosbuvir:** 530,21>243,03; **GS-331007:** 261,13>112,95 (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015);
- **sofosbuvir:** 530,3>243,1; **GS-331007:** 261,5>113,1 (SHI et al., 2015);
- **sofosbuvir:** 530,05>243,05; **GS-331007:** 258,10>239,10 (modo negativo) (ARIAUDO et al., 2016);
- **sofosbuvir:** 530,3>243,1; **GS-331007:** 261,5>113,1 (PAN et al., 2016);
- **sofosbuvir:** 530.21>243.03; **GS-331007:** 261.13>112.95 (ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017);
- **sofosbuvir:** 530.21>243.03; **GS-331007:** 261.13>112.95 (NOTARI et al., 2018);
- **sofosbuvir:** 530.21>243.03; **GS-331007:** 261.13>112.95 (SEMREEN et al., 2019);
- **sofosbuvir:** 530.21>243.03; **GS-331007:** 261.13>112.95 (SEYEN et al., 2019);
- **sofosbuvir:** 530.21>243.03; **GS-331007:** 261.13>112.95 (FERRARI et al., 2019);
- **sofosbuvir:** 530.21>243.03; **GS-331007:** 261.13>112.95 (SHEN et al., 2019);
- **sofosbuvir:** 530,1>242,8; **GS-331007:** 260,8>112,9 (GARDINALI et al., 2020).

Em relação às transições dos candidatos a padrão interno zidovudina e diazepam, observou-se que os resultados obtidos também estão de acordo com as publicações que as utilizaram como tal:

- **diazepam:** 285,2>193,1 (PAN et al., 2016);
- **zidovudina:** 267,9>127,0 (GARDINALI et al., 2020).

Vale ressaltar que durante todo o desenvolvimento das metodologias, foram monitoradas duas transições para cada substância. Os testes preliminares dos parâmetros da validação (seção 4.1.7) confirmaram a ausência de interferência nas substâncias analisadas e, por esse motivo, apenas a transição de quantificação foi utilizada nos ensaios de validação. Além disso, caso fosse identificada alguma interferência durante a validação, a metodologia seria revista e o problema corrigido para então o protocolo de validação ser reiniciado. A tabela 8 apresenta as transições selecionadas para quantificação e os demais parâmetros do espectrômetro de massas.

Tabela 8 - Parâmetros do espectrômetro de massas para as transições iônicas selecionadas para quantificação

<b>Substância</b>	<b>Modo</b>	<b>Transição (m/z)</b>	<b>IS (V)</b>	<b>Dwell time (ms)</b>	<b>DP (V)</b>	<b>CE (V)</b>	<b>EP (V)</b>	<b>CXP (V)</b>
Sofosbuvir	positivo	530,0>242,8	5500	150	91	25	10	13
GS-331007	positivo	261,0>112,8	5500	150	60	20	10	10
Cimetidina	positivo	253,0>116,9	5500	150	16	21	10	10
Zidovudina	positivo	268,0>127,0	5500	150	26	9	10	6
Diazepam	positivo	285,0>193,0	5500	150	76	43	10	13

Fonte: (Do autor, 2022).

Esse trabalho inicial demonstrou que os analitos e os candidatos a padrão interno (cimetidina, zidovudina e diazepam) são compatíveis com a análise por LC-MS/MS, pois apresentaram estabilidade e ionização adequada nas condições investigadas.

#### 4.1.4.2 Injeção em fluxo (FIA)

O procedimento denominado FIA foi realizado para estabelecer as melhores condições da fonte eletrospray para a análise de sofosbuvir e GS-331007 em matrizes biológicas. Para atingir esse propósito, 10 µL de soluções dos analitos na concentração de 50 ng/mL foram introduzidas no sistema com auxílio do autoinjeter. Nessa etapa do trabalho, utilizou-se, com sucesso, a mesma fase móvel do trabalho

de Rezk; Basalious & Karim (2015): acetonitrila:água (50:50, v/v) acidificada com ácido fórmico a 0,1 % (v/v).

A temperatura da fonte foi ajustada para 400 °C e então foram realizados incrementos graduais de 50 °C, observando-se o resultado obtido. A melhor condição foi alcançada em 600 °C, pois essa temperatura proporcionou um aumento na taxa de evaporação da fase móvel, resultando em maior eficiência de ionização e sensibilidade analítica. Também foi observado que temperaturas superiores a 600 °C ocasionaram redução de sensibilidade, possivelmente por fragmentação dos analitos na fonte do espectrômetro de massas.

No que diz respeito aos valores definidos para os parâmetros relacionados ao fluxo de gás, a investigação foi conduzida de forma a obter alta sensibilidade analítica e ao mesmo tempo prevenir a entrada de contaminantes no espectrômetro de massas, que cabe ao gás de cortina. Tais contaminantes poderiam prejudicar a relação sinal/ruído e então reduzir a sensibilidade. Assim sendo, foi adotado o maior valor possível de gás de cortina sem provocar perda de sinal. A tabela 9 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 9 - Parâmetros da fonte ESI - Injeção em fluxo (FIA)

Parâmetro	Valor
Temperatura (°C)	600
Fluxo de gás de colisão (CAD, psi)	Alto
Fluxo de gás de nebulização (GS1, psi)	60
Fluxo de gás de aquecimento/secagem (GS2, psi)	50
Fluxo de gás de cortina (CUR, psi)	20

Fonte: (Do autor, 2022).

Uma vez definidos os melhores parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas, o próximo passo foi investigar e estabelecer as melhores condições cromatográficas para as análises.

#### 4.1.5 Condições cromatográficas

Em um primeiro momento, os testes para verificação das condições cromatográficas foram executados injetando-se soluções padrão dos analitos e

candidatos a padrão interno na concentração de 50 ng/mL. Esses testes foram conduzidos utilizando-se como referência a fase móvel do trabalho dos autores Rezk, Basalious e Karim (2015), isto é, solução composta por 50 % de acetonitrila e 50 % de água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v).

O objetivo dessas injeções foi identificar os picos cromatográficos dos compostos de interesse sem a presença de constituintes da matriz biológica. Além disso, serviram para auxiliar na verificação da adequabilidade das condições instrumentais estabelecidas para o espectrômetro de massas (4.1.4). No entanto, é aconselhado que os experimentos para determinação da melhor condição cromatográfica compreendam a avaliação de amostras na matriz biológica em estudo observando as particularidades de cada matriz (RAPOLD, 2018).

Diante do exposto, foram realizados testes com amostras extraídas da matriz biológica (conforme protocolo de extração descrito na seção 4.1.6). Os ensaios foram iniciados pela matriz plasma devido à maior disponibilidade de plasma branco.

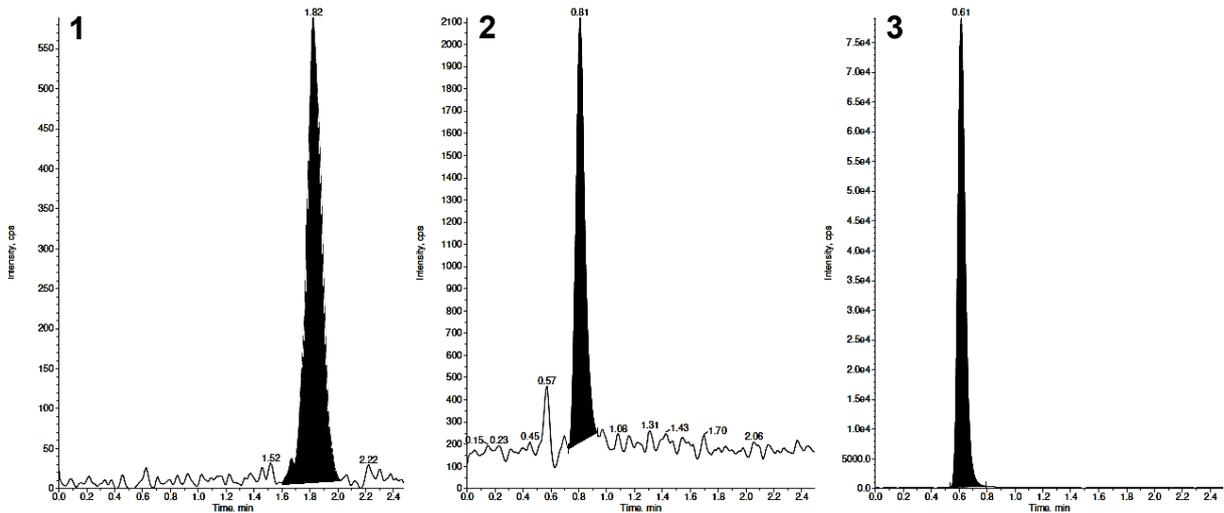
#### *4.1.5.1 Condições cromatográficas - matriz plasma*

Os testes foram conduzidos utilizando como ponto de partida a publicação dos autores Rezk; Basalious e Karim (2015), a qual apresenta a determinação de sofobuvir e GS-331007 em plasma humano por LC-MS/MS. Os referidos autores utilizaram como fase móvel uma solução composta por 50 % de solvente orgânico (acetonitrila) e 50 % de água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v), que foi eluída de forma isocrática em uma coluna C18 (Acquity UPLC C18 HSS 1,8  $\mu$ m, 2,1 x 50 mm) em temperatura de 25 °C. Além disso, empregaram a famotidina, um antagonista de receptor de histamina, como padrão interno.

Assim, os primeiros testes foram conduzidos utilizando uma coluna cromatográfica de recheio C18 (Gemini NX-C18 5  $\mu$ m, 4,6 x 50 mm) utilizando a cimetidina como padrão interno, a qual apresenta similaridades estruturais com a famotidina, conforme pode ser visto nas figuras 14 e 15. A fase móvel empregada foi composta por uma porção aquosa (FMA) e uma porção orgânica (FMO), sendo a FMA constituída por água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v) e a FMO por apenas por acetonitrila. Ela foi eluída na proporção de 50 % de FMA e 50 % de FMO na vazão de 1,0 mL/min. Aliás, essa vazão é compatível com a temperatura otimizada para a fonte

do espectrômetro de massas, ou seja, 600 °C. A figura 30 ilustra os cromatogramas obtidos nas condições supramencionadas.

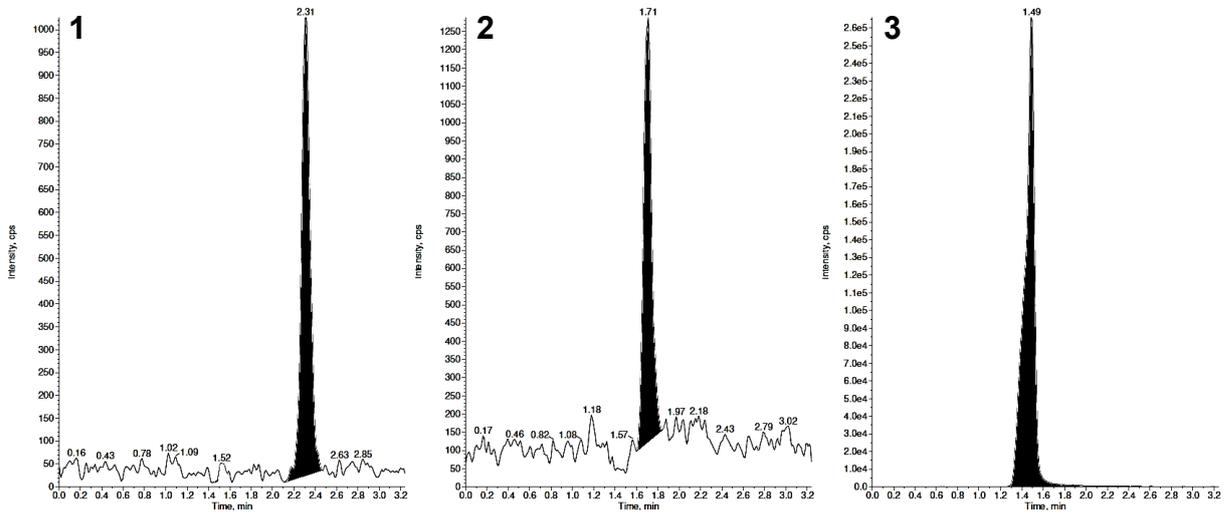
Figura 30 - Amostra de plasma. Coluna Gemini NX-C18, 50 mm. Fase móvel: 50 % acetonitrila + 50 % de água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v) - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (cimetidina)



Fonte: (Do autor, 2022)

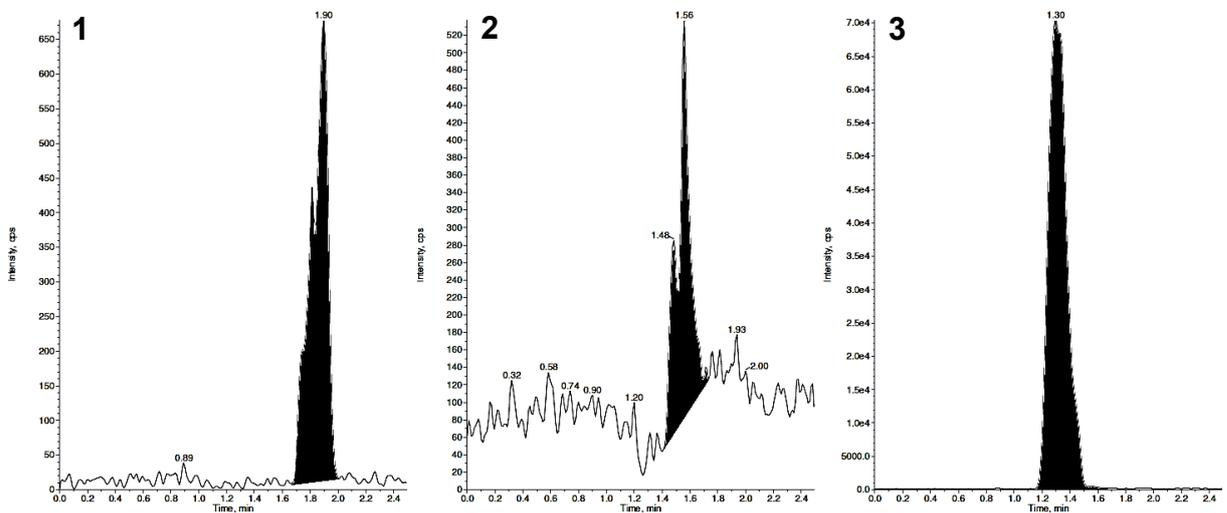
Os resultados iniciais, embora animadores, não desestimularam a apreciação de outras fases estacionárias. Por conseguinte, outras colunas foram testadas: uma C18 de maior comprimento (Gemini C18 5  $\mu$ m, 4,6 x 150 mm) e outra C8, que possui o recheio de caráter menos apolar (ACE C8 5  $\mu$ m, 4,6 x 100 mm). As figuras 31 e 32 apresentam os resultados obtidos.

Figura 31 - Amostra de plasma. Coluna Gemini C18, 150 mm. Fase móvel: 50 % acetonitrila + 50 % de água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v) - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (cimetidina)



Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 32 - Amostra de plasma. Coluna ACE C8, 100 mm. Fase móvel: 50 % acetonitrila + 50 % de água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v) - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (cimetidina)



Fonte: (Do autor, 2022).

Apesar dos resultados positivos com a coluna C18 de 150 mm, optou-se por continuar os testes com a coluna de 50 mm devido ao reduzido tempo de corrida, que proporciona maior velocidade nas análises. Por outro lado, a coluna C8 apresentou piora no perfil e resposta cromatográfica, possivelmente pela menor capacidade de

retenção e separação dos analitos de interferentes da matriz biológica, sendo, então, desconsiderada para as investigações subsequentes.

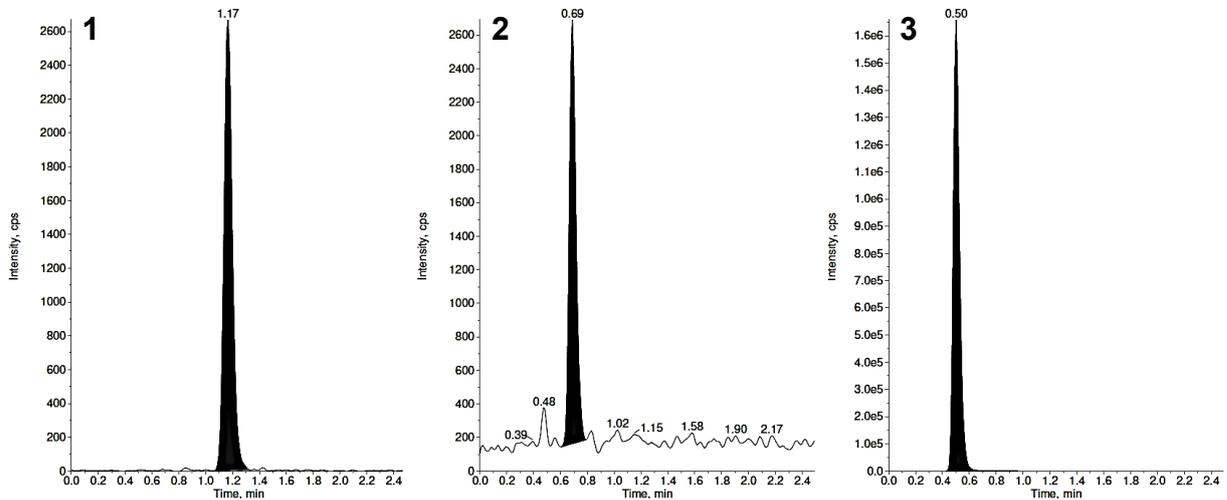
Além disso, nesta etapa, outros elementos cromatográficos também foram avaliados: adição de metanol na fase móvel; pressão do sistema; fluxo de eluição; temperatura do forno de coluna; proporção entre os solventes orgânico e aquoso na fase móvel; solução de lavagem do sistema cromatográfico; volume de injeção e a temperatura do autoinjeter.

Observou-se que a inclusão de metanol como um dos componentes da fração orgânica da fase móvel (FMO) na proporção de 80 % de metanol e 20 % de acetonitrila, resultou em maior resposta cromatográfica e, em consequência, maior sensibilidade analítica. Esse achado converge com publicações da literatura, as quais atribuem ao metanol o aumento da intensidade do sinal cromatográfico (ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017; FERRARI et al., 2019).

Ademais, o metanol, por possuir menor força eluente do que a acetonitrila em cromatografia de fase reversa, reduziu a força eluotrópica da fase móvel, propiciando uma melhor resolução cromatográfica. No entanto, por ser mais viscoso do que a acetonitrila ocasionou um ligeiro aumento da pressão do sistema. Ainda que não tenha atingido níveis alarmantes, esse aumento da pressão foi compensado pela subsequente redução do fluxo para 0,80 mL/min e ajuste da temperatura do forno da coluna para 45 °C, propiciando resultados satisfatórios.

Em conclusão, a figura 33 ilustra o melhor resultado encontrado após os testes realizados, que consistiram em: inclusão de metanol na porção orgânica (FMO) da fase móvel (metanol:acetonitrila 80:20, v/v); modificação na proporção de eluição, sendo empregada a proporção de 35 % de FMA e 65 % de FMO; elevação da temperatura do forno de coluna para 45 °C e, por fim, diminuição da vazão para 0,80 mL/min. Os picos obtidos apresentaram-se estreitos, simétricos, resolvidos e livres de ombros ou caudas.

Figura 33 - Amostra de plasma. Coluna Gemini NX-C18, 50 mm. Fase móvel: 65 % (metanol:acetonitrila, 80:20 v/v) + 35 % de água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v). Coluna em 45 °C - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (cimetidina)



Fonte: (Do autor, 2022).

Com o objetivo de prevenir a ocorrência de contaminação entre as injeções, foram testadas diferentes soluções de lavagem do sistema cromatográfico. Os testes foram realizados com metanol e água em diferentes proporções, tendo sido observado o melhor resultado com apenas metanol. O ensaio para avaliação do arraste (seção 4.2.3) atesta essa observação preliminar.

O aumento do volume de injeção de 10  $\mu$ L para 20  $\mu$ L também foi examinado durante os estágios iniciais do desenvolvimento cromatográfico. Tal aumento, poderia levar a uma maior sensibilidade analítica, favorecendo a quantificação das concentrações mais baixas. No entanto, o perfil cromatográfico ficou prejudicado, pois foi observado alargamento dos picos, possivelmente causado por saturação da coluna e dispersão da amostra.

Por fim, a temperatura do autoinjeter foi ajustada para 10 °C, pois evitou a evaporação e possível degradação das amostras, assegurando a estabilidade das amostras pós-processadas. A respeito desse assunto, o ensaio de estabilidade pós-extração (pós-processamento) foi realizado com o autoinjeter em 10 °C e serviu para averiguar a estabilidade das amostras extraídas no autoinjeter do equipamento. Os resultados desse ensaio são apresentados na seção 4.2.6.

Em suma, a partir dos experimentos descritos nesta seção, foram estabelecidas as seguintes condições para a determinação simultânea de sofosbuvir e GS-331007 em plasma humano, conforme apresentado na tabela 10.

Tabela 10 - Condições de análise em plasma

<b>Parâmetro</b>	<b>Resultado</b>
Coluna	Gemini NX-C18 5 $\mu$ m, 4,6 x 50 mm
FMO	Metanol:acetoneitrila (80:20, v/v);
FMA	Água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v);
Proporção de eluição	65 % de FMO e 35 % de FMA
Fluxo de fase móvel	0,80 mL/min
Solução de lavagem	Metanol
Temperatura do forno	45 °C
Pressão do sistema	70 bar
Volume de injeção	10 $\mu$ L
Temperatura do autoinjeter	10 °C
Padrão interno (PI)	Cimetidina

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.1.5.2 Condições cromatográficas - matriz líquor e fluido seminal

Inicialmente, os experimentos foram conduzidos empregando-se a condição cromatográfica estabelecida para o plasma (seção 4.1.5.1). Porém, algumas modificações foram necessárias a fim de alcançar resultados mais satisfatórios.

Primeiramente, foi necessário o emprego de uma coluna C18 de maior comprimento (Gemini C18 5  $\mu$ m, 4,6 x 150 mm), que foi especialmente importante para o metabólito GS-331007. Embora possua o mesmo diâmetro e tamanho de partícula da coluna utilizada para o plasma (50 mm de comprimento), a coluna de 150 mm proporcionou maior resolução cromatográfica e, assim, melhor separação de picos interferentes de origem endógena próximos ao tempo de retenção do analito GS-331007.

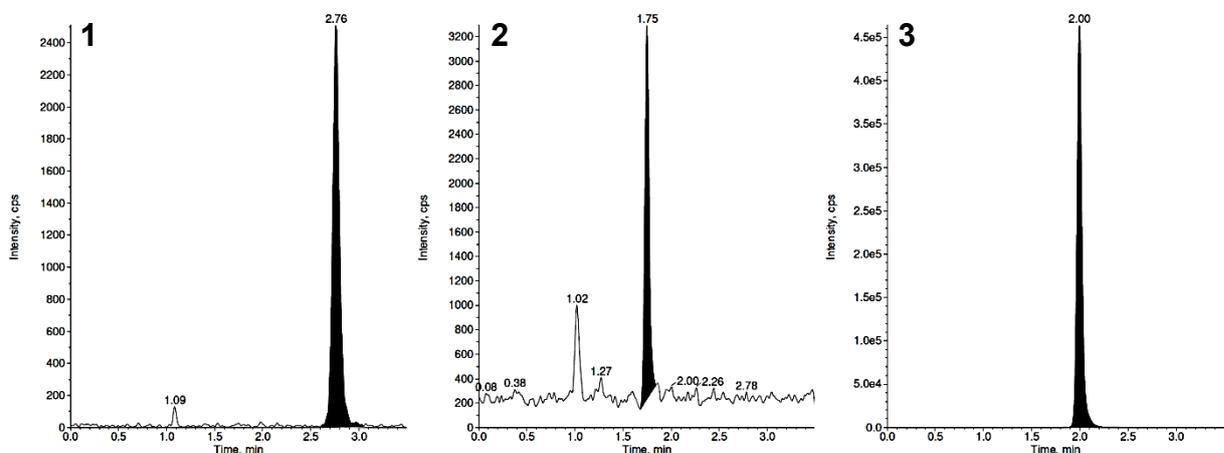
Em segundo lugar, foi realizado uma modificação na proporção de eluição da e na vazão da fase móvel, tendo o melhor resultado sido obtido na proporção de 68 % de FMO (metanol:acetoneitrila 80:20, v/v) e 32 % de FMA (água com ácido fórmico a

0,1 %, v/v) e fluxo de 1,00 mL/min. Como resultado, foi observada melhora no perfil cromatográfico e redução no tempo total de corrida. Vale mencionar que a proporção de eluição de 70 % FMO também foi testada, mas o resultado obtido apresentou-se inferior.

Em terceiro lugar, apenas para a análise das amostras de fluido seminal, a temperatura de eluição também foi modificada. Ela foi reduzida para 22 °C (temperatura ambiente), pois proporcionou melhor separação entre o pico de GS-331007 e de um interferente endógeno (pico em 2,38 min). Vale salientar que, apesar da eluição ter sido conduzida em temperatura ambiente, não houve prejuízo na reprodutibilidade nem variação nos tempos de retenção, pois a temperatura do laboratório foi mantida dentro do limite de  $22 \pm 2$  °C.

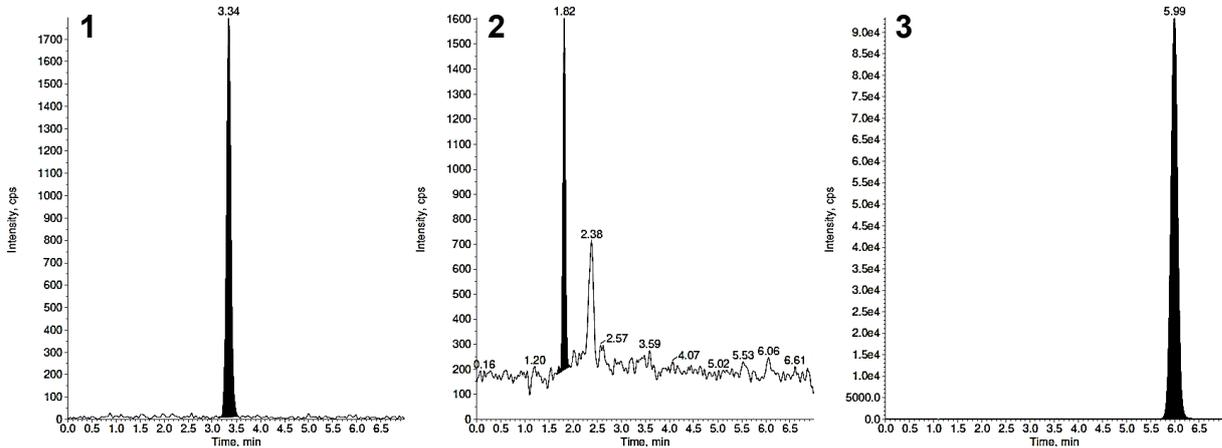
Finalizando, foi observado que o emprego de zidovudina e diazepam como padrão interno apresentou melhores resultados do que a cimetidina. A zidovudina foi adotada como padrão interno para a quantificação em líquido, enquanto o diazepam para o fluido seminal. A escolha das referidas substâncias como padrão interno está de acordo com estudos da literatura conforme discorrido em 4.1.2. As figuras 34 e 35 a seguir ilustram, respectivamente, os cromatogramas obtidos nas análises de líquido e fluido seminal humanos.

Figura 34 - Amostra de líquido. Coluna Gemini C18, 150 mm. Fase móvel: 68 % (metanol:acetonitrila, 80:20 v/v) + 32 % de água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v). Coluna em 45 °C - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (zidovudina)



Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 35 - Amostra de fluido seminal. Coluna Gemini C18, 150 mm. Fase móvel: 68 % (metanol:acetonitrila, 80:20 v/v) + 32 % de água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v). Coluna em 22 °C - (1): sofobuvir; (2): GS-331007 e interferente (2,38 min.); (3): PI (diazepam)



Fonte: (Do autor, 2022).

Um resumo das condições estabelecidas para a determinação simultânea de sofobuvir e GS-331007 em líquido e fluido seminal humano é apresentado nas tabelas 11 e 12 a seguir.

Tabela 11 - Condições de análise em líquido

Parâmetro	Resultado
Coluna	Gemini C18 5 µm, 4,6 x 150 mm
FMO	Metanol:acetonitrila (80:20, v/v);
FMA	Água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v);
Proporção de eluição	68 % de FMO e 32 % de FMA
Fluxo de fase móvel	1,00 mL/min
Solução de lavagem	Metanol
Temperatura do forno	45 °C
Pressão do sistema	100 bar
Volume de injeção	10 µL
Temperatura do autoinjeter	10 °C
Padrão interno (PI)	Zidovudina

Fonte: (Do autor, 2022).

Tabela 12 - Condições de análise em fluido seminal

Parâmetro	Resultado
Coluna	Gemini C18 5 µm, 4,6 x 150 mm
FMO	Metanol:acetonitrila (80:20, v/v);
FMA	Água com ácido fórmico a 0,1 % (v/v);
Proporção de eluição	68 % de FMO e 32 % de FMA
Fluxo de fase móvel	1,00 mL/min
Solução de lavagem	Metanol
Temperatura do forno	22 °C
Pressão do sistema	120 bar
Volume de injeção	10 µL
Temperatura do autoinjeter	10 °C
Padrão interno (PI)	Diazepam

Fonte: (Do autor, 2022).

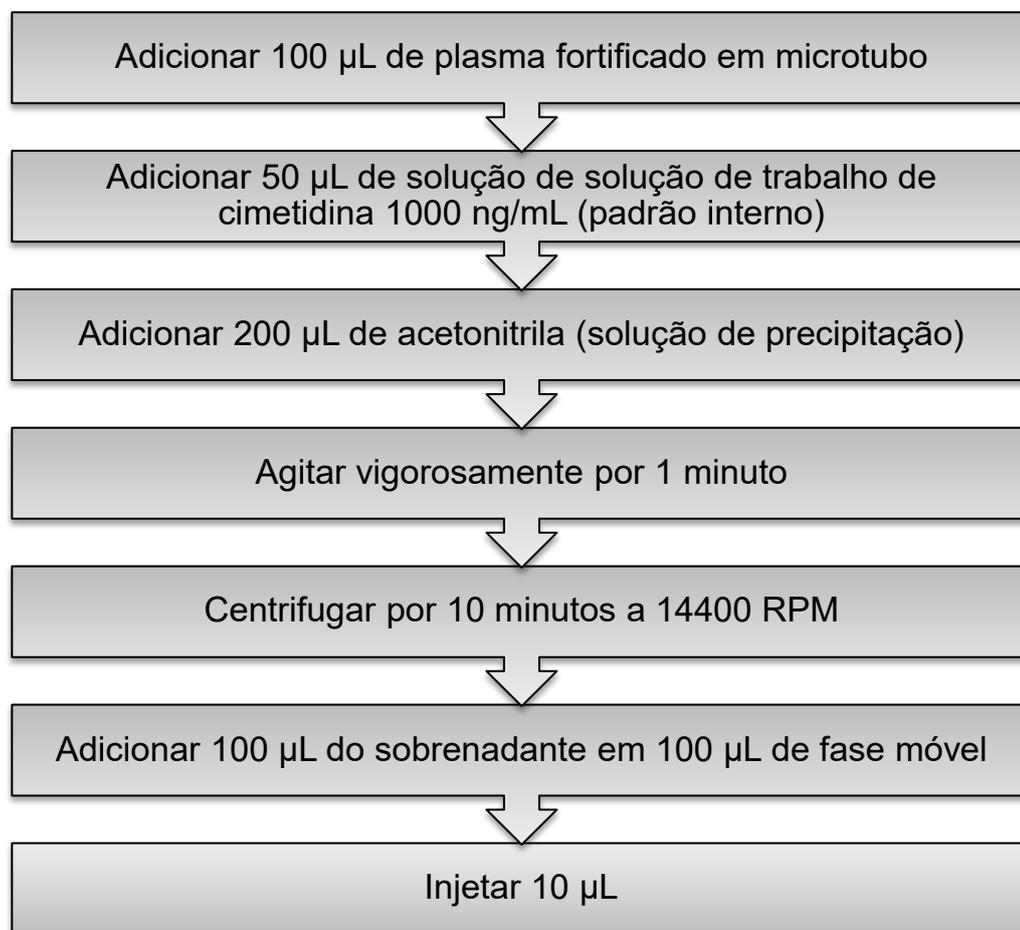
#### 4.1.6 Extração das amostras

##### 4.1.6.1 Extração das amostras - matriz plasma

Antes de iniciar os testes, efetuou-se fortificação do plasma branco com concentrações conhecidas dos analitos. Em seguida, aliquotou-se 100 µL do plasma fortificado para um microtubo de 2 mL e então procedeu-se a extração.

A técnica de precipitação de proteínas foi a primeira abordagem utilizada para definição do procedimento de extração das amostras. A acetonitrila foi utilizada como agente precipitante, conforme recomendado em publicações sobre o tema (SHI et al., 2015; PAN et al., 2016; FERRARI et al., 2019). O fluxograma da figura 36 mostra, de forma esquemática, o primeiro protocolo de extração testado.

Figura 36 - Protocolo de extração por precipitação de proteínas - plasma



Fonte: (Do autor, 2022).

Embora seja extremamente rápida, a extração por precipitação de proteínas não apresentou resultados satisfatórios, conforme descrito no trabalho de Ariaudo e colaboradores (2016). Obteve-se redução na resposta analítica e aumento na variabilidade dos resultados, possivelmente devido ao efeito matriz e baixa recuperação. Portanto, essa técnica foi desconsiderada para os próximos testes.

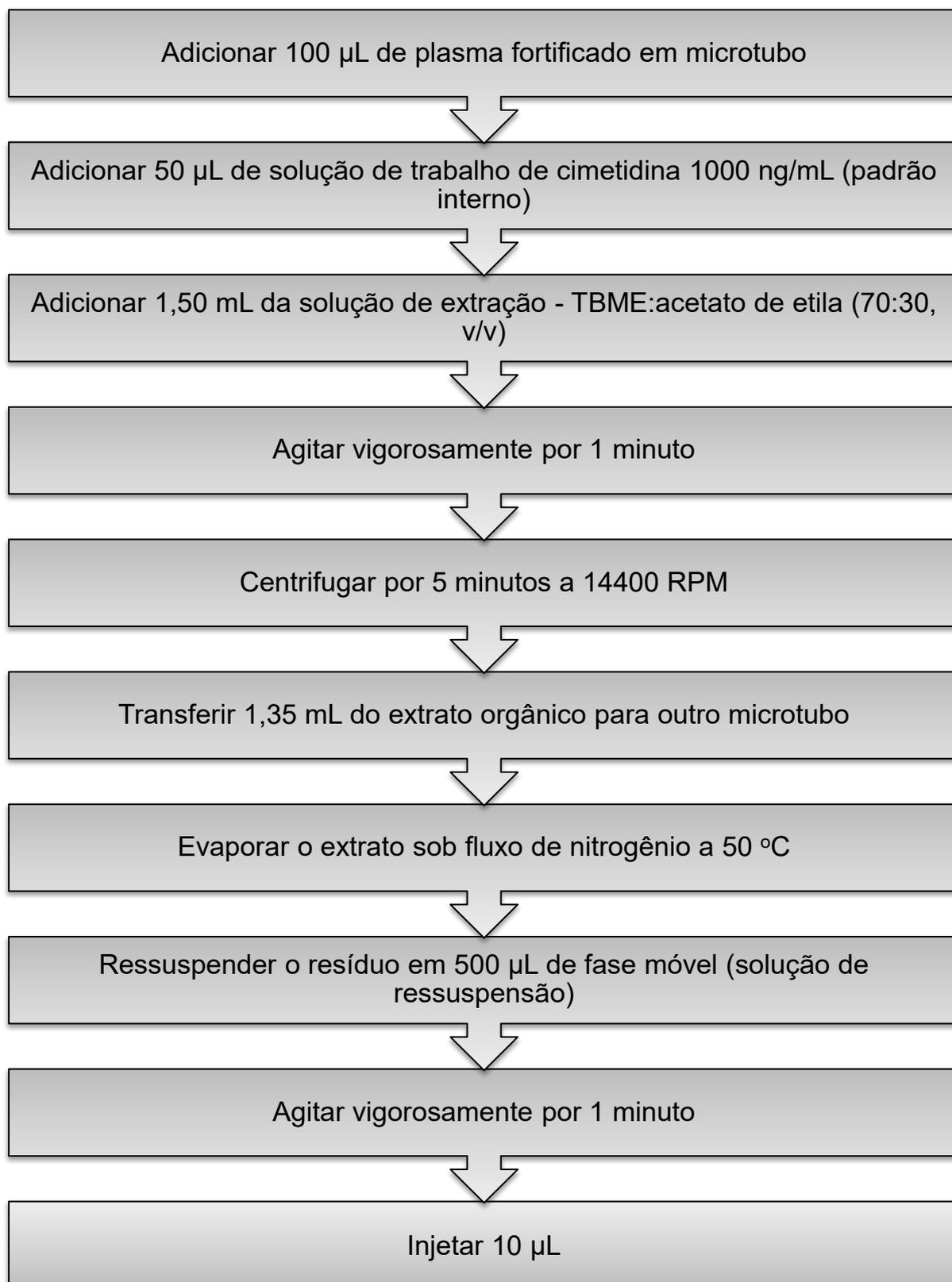
Em continuidade, foram realizados experimentos utilizando a técnica de extração líquido-líquido em microtubo de 2 mL. Os solventes disponíveis no laboratório foram avaliados, tendo sido obtidos os melhores resultados com o emprego de 1500 µL de éter etil-terc-butílico (TBME) e acetato de etila na proporção 70:30 (v/v) para extrair o volume de 100 µL de plasma. Em comparação aos estudos da literatura, a metodologia desenvolvida propiciou baixo consumo da matriz biológica e de solvente extrator (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; ABDALLAH; ABDEL-

MEGIED; GOUDA, 2017; SEMREEN et al., 2019). Assim, possibilitou a análise de amostras clínicas com volume reduzido, isto é, de 100  $\mu\text{L}$ , e permitiu o consumo de menor volume de solvente de extração por amostra analisada.

Quanto ao volume de utilizado para ressuspensão do resíduo, os testes realizados mostraram que a ressuspensão das amostras em um volume de 1000  $\mu\text{L}$  provocou menor resposta cromatográfica, inviabilizando a quantificação de amostras de baixa concentração. Ao contrário, o volume de ressuspensão de 500  $\mu\text{L}$  propiciou os melhores resultados, sendo então adotado para as análises da matriz plasma. Comparando o resultado obtido com estudos da literatura, o método desenvolvido permitiu o emprego de um maior volume de ressuspensão, gerando amostras mais limpas antes da injeção no sistema cromatográfico (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017; GARDINALI et al., 2020).

Como desfecho, o método de extração desenvolvido apresentou-se rápido, exato e preciso. O fluxograma da figura 37 apresenta o método desenvolvido para a extração de sofosbuvir e GS-331007 de plasma humano.

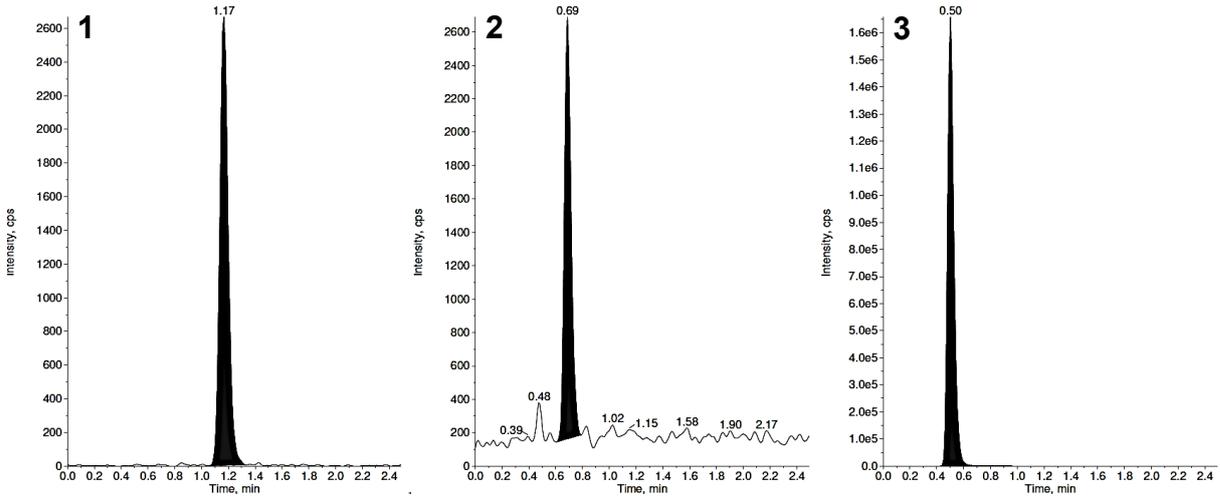
Figura 37 - Protocolo de extração líquido-líquido - plasma



Fonte: (Do autor, 2022).

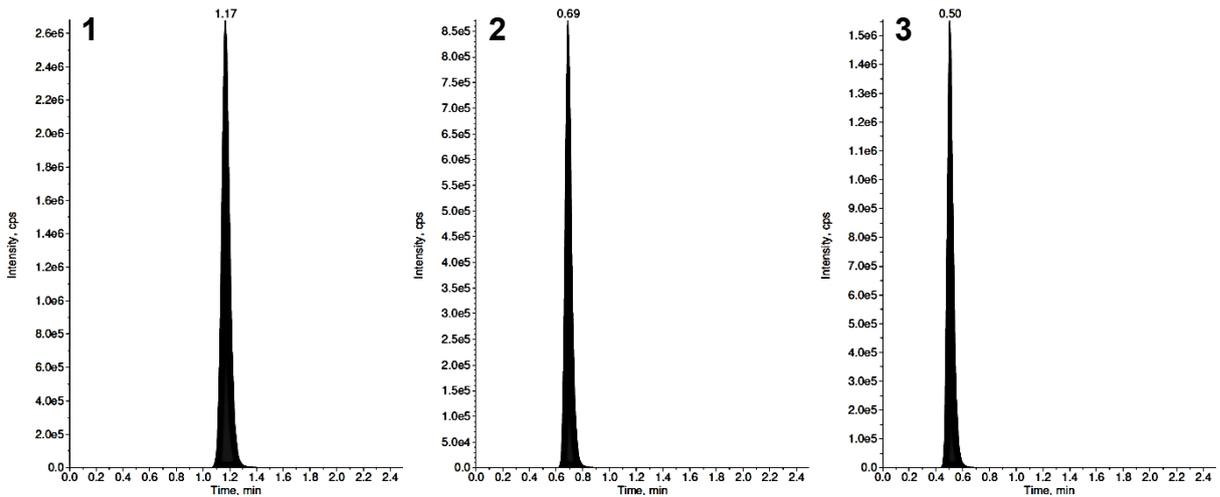
As figuras 38 e 39 a seguir apresentam os cromatogramas de amostras extraídas de baixa e alta concentração em plasma humano.

Figura 38 - Plasma - baixa concentração (sofosbuvir = 1,50 ng/mL e GS-331007 = 5,00 ng/mL). Solução de extração TBME:acetato de etila (70:30, v/v) - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (cimetidina)



Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 39 - Plasma - alta concentração (sofosbuvir = 1600,00 ng/mL e GS-331007 = 1600,00 ng/mL). Solução de extração TBME:acetato de etila (70:30, v/v) - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (cimetidina).



Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.1.6.2 *Extração das amostras - matriz líquido e fluido seminal*

O início das investigações compreendeu a fortificação da matriz branca com concentrações conhecidas dos analitos. Após esse procedimento, uma alíquota de apenas 50 µL da matriz fortificada foi pipetada em microtubo de 2 mL e então submetida ao processo de extração, que foi conduzido de maneira diversa do estabelecido para o plasma. Vale apontar que o volume de 100 µL não foi testado devido à escassez de matriz branca de líquido e fluido seminal.

Em primeiro lugar, a extração dos analitos (e padrões internos) do líquido e fluido seminal foi realizada apenas com acetato de etila como agente extrator, pois foi observado um aumento na resposta de picos interferentes quando o agente extrator TBME:acetato de etila (70:30, v/v) era empregado nessas matrizes. Esse achado, que não foi obtido com a matriz plasma, pode ser justificado, possivelmente, devido às características intrínsecas de cada matriz.

Além disso, também foram realizadas outras duas mudanças em relação ao protocolo de extração desenvolvido para o plasma. A primeira alteração consistiu no congelamento (-70 °C) das amostras após a centrifugação. Essa etapa, proporcionou a transferência total do extrato orgânico, que, aliás, não sofre congelamento, para outro microtubo. A outra alteração consistiu na redução do volume de ressuspensão (de para 500 para 150 µL). Objetivou-se com essas intervenções aumentar o sinal cromatográfico, especialmente do metabólito GS-331007, que se mostrou reduzido quando comparado ao plasma. No entanto, ainda assim, não foi possível alcançar o mesmo limite inferior de quantificação obtido para a matriz plasma. Ainda sobre o volume de ressuspensão, vale mencionar que volumes menores do que 150 µL não apresentaram vantagens, pois a melhor relação sinal/ruído foi obtida utilizando amostras mais diluídas (ressuspensão em 150 µL de fase móvel).

Finalmente, apenas para a matriz fluido seminal, foi realizada a acidificação prévia das amostras a fim de corrigir a variabilidade dos resultados obtidos sem essa acidificação. Para esse fim, foi utilizada uma solução aquosa de ácido fórmico 1 mol/L, que gerou resultados satisfatórios e mais homogêneos.

Os fluxogramas das figuras 40 e 41 apresentam, respectivamente, os métodos de extração definidos para o líquido e fluido seminal. As figuras 42 e 43 apresentam os cromatogramas de amostras de líquido (baixa e alta concentração), enquanto as

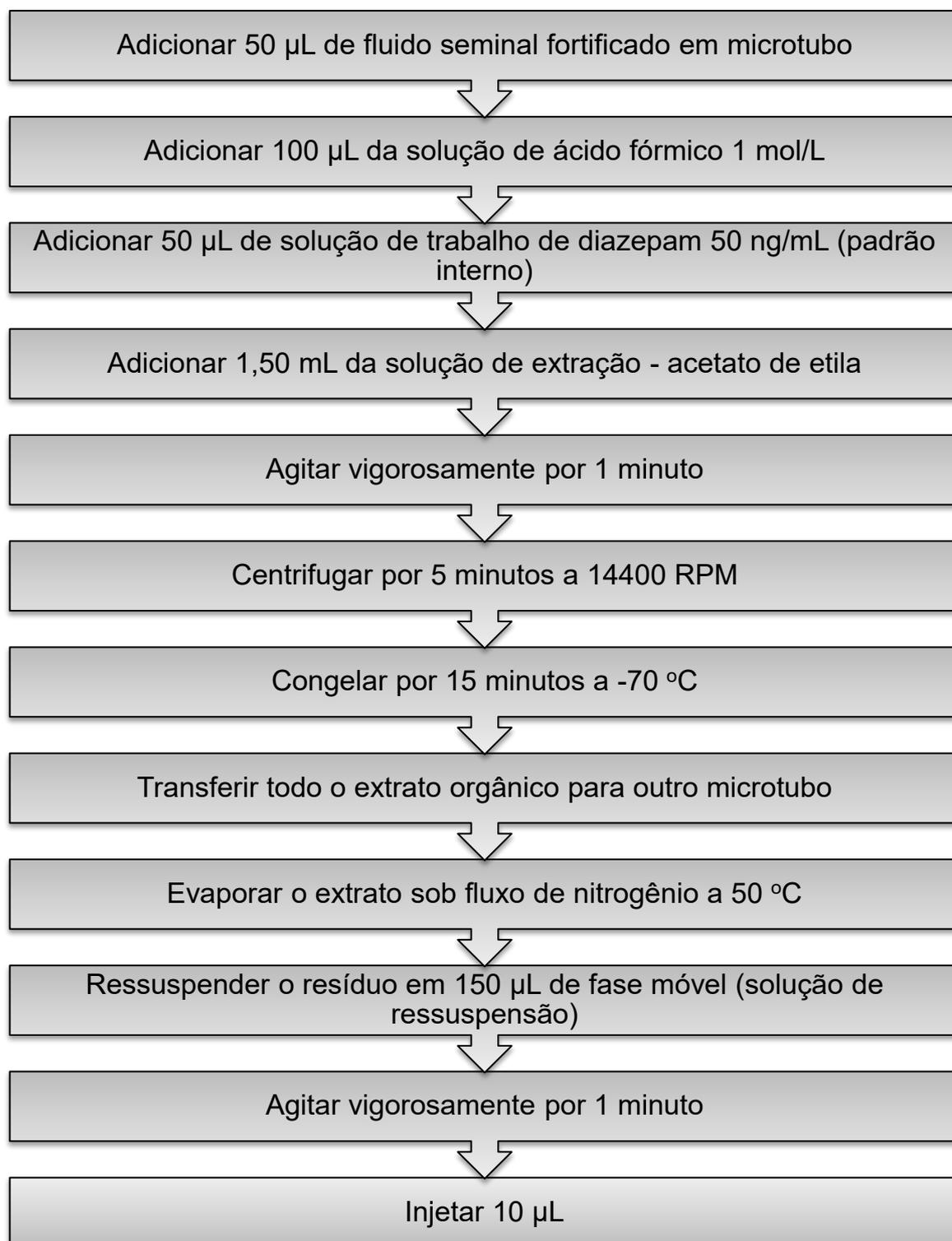
figuras 44 e 45 apresentam os cromatogramas de amostras extraídas de fluido seminal.

Figura 40 - Protocolo de extração líquido-líquido - líquor



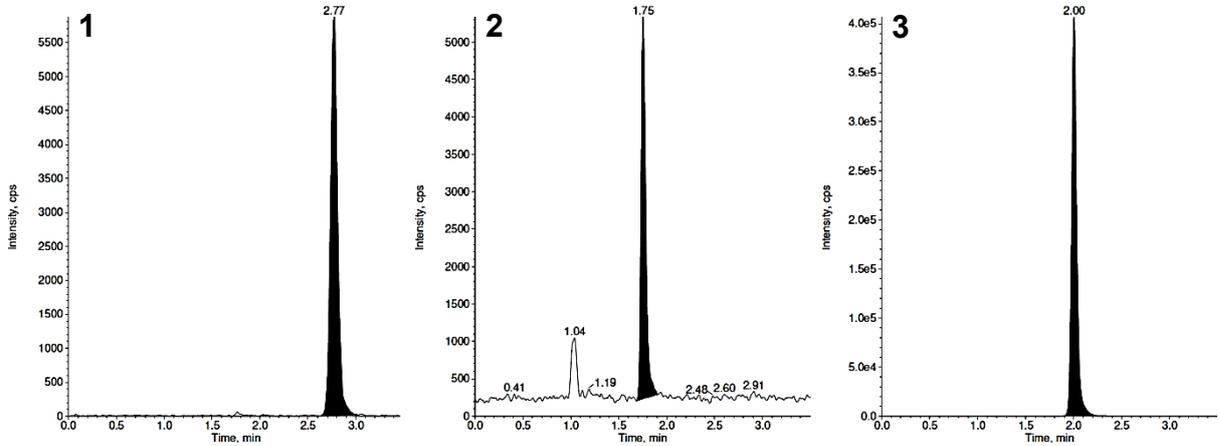
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 41 - Protocolo de extração líquido-líquido - fluido seminal



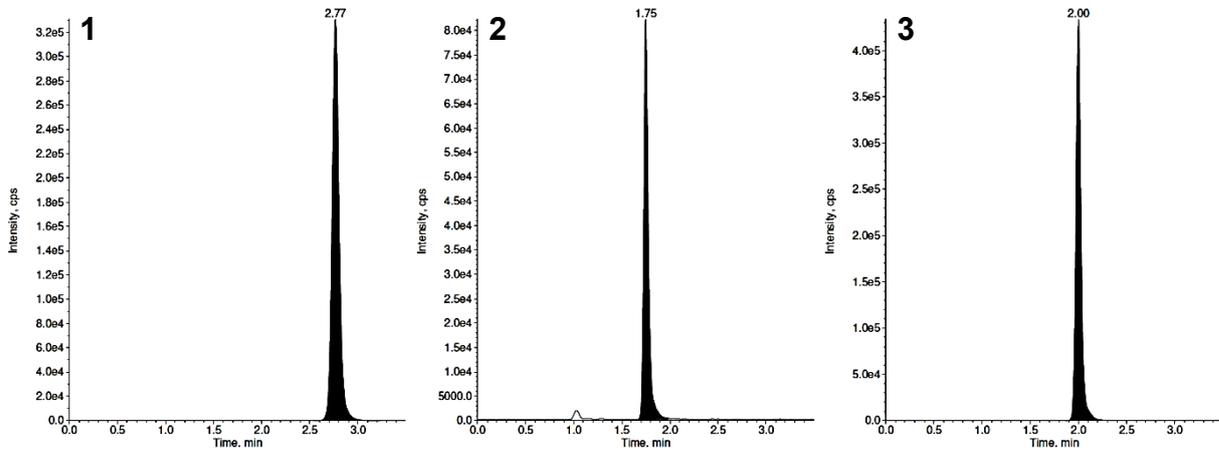
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 42 - Líquor - baixa concentração (sofosbuvir = 1,50 ng/mL e GS-331007 = 10,00 ng/mL). Solução de extração acetato de etila - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (zidovudina)



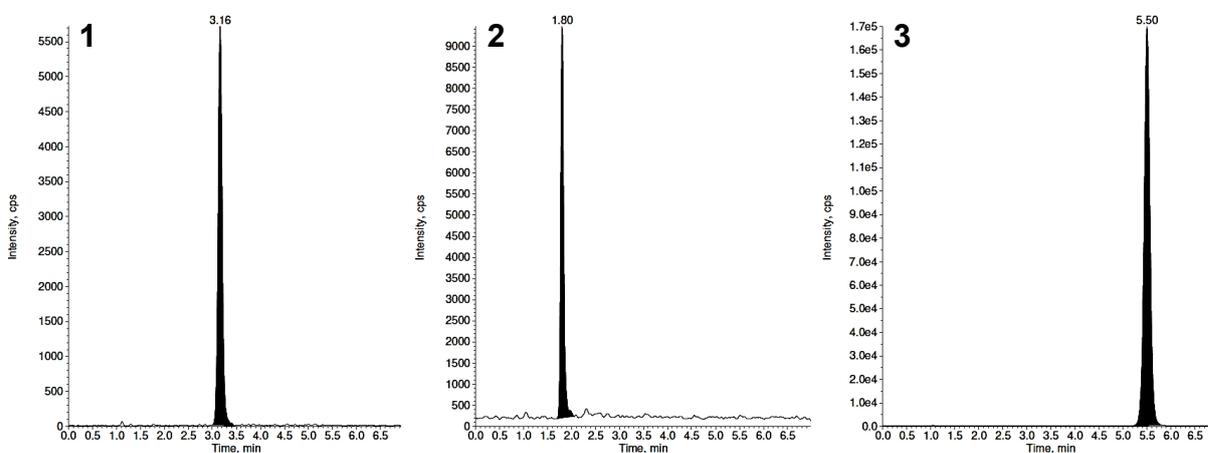
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 43 - Líquor - alta concentração (sofosbuvir = 80,00 ng/mL e GS-331007 = 150,00 ng/mL). Solução de extração acetato de etila - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (zidovudina)



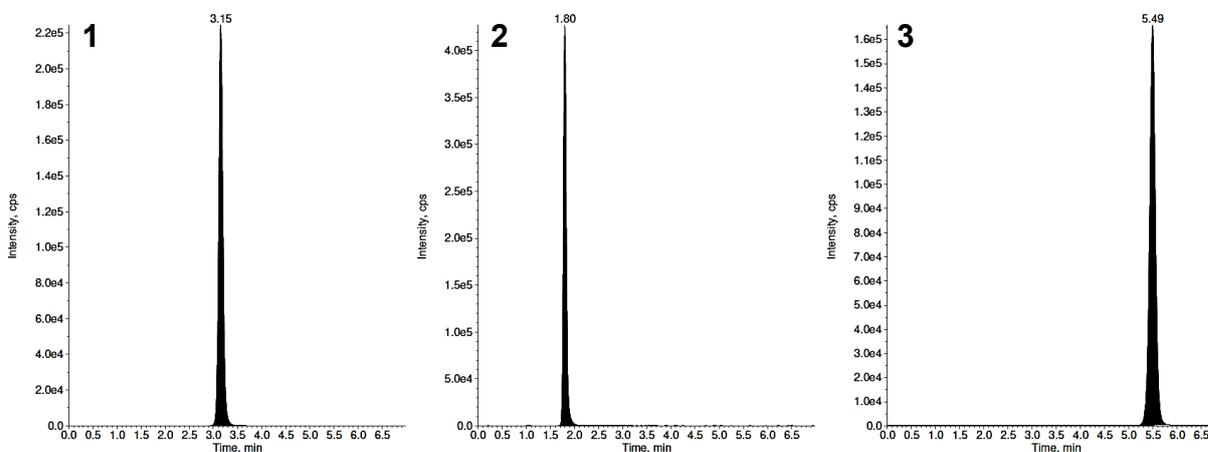
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 44 - Fluido seminal - baixa concentração (sofosbuvir = 1,50 ng/mL e GS-331007 = 25,00 ng/mL). Solução de extração acetato de etila - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (diazepam)



Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 45 - Fluido seminal - alta concentração (sofosbuvir = 80,00 ng/mL e GS-331007 = 1200,00 ng/mL). Solução de extração acetato de etila - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (diazepam)



Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.1.7 Investigação preliminar de parâmetros da validação

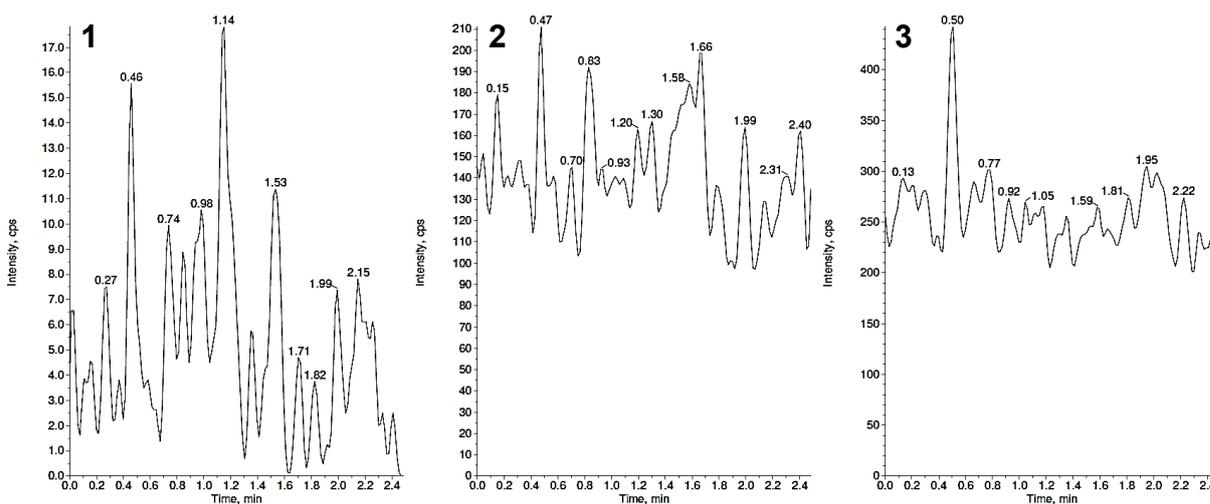
Foram verificados os parâmetros relacionados à seletividade; efeito matriz; grau de perturbação dos interferentes potenciais (nicotina e cafeína); grau de contaminação cruzada (*carry over*); precisão, exatidão e o processo de diluição das amostras com concentração acima do limite superior da curva de calibração.

No que diz respeito à seletividade, foi investigada a interferência causada por compostos endógenos, sendo analisadas amostras de brancos das matrizes

biológicas, ou seja, isentas do analito e padrão interno. Aliás, é fundamental que essa interferência seja investigada ainda nos estágios iniciais do desenvolvimento, pois ela pode comprometer a precisão e exatidão dos resultados (RAPOLD, 2018).

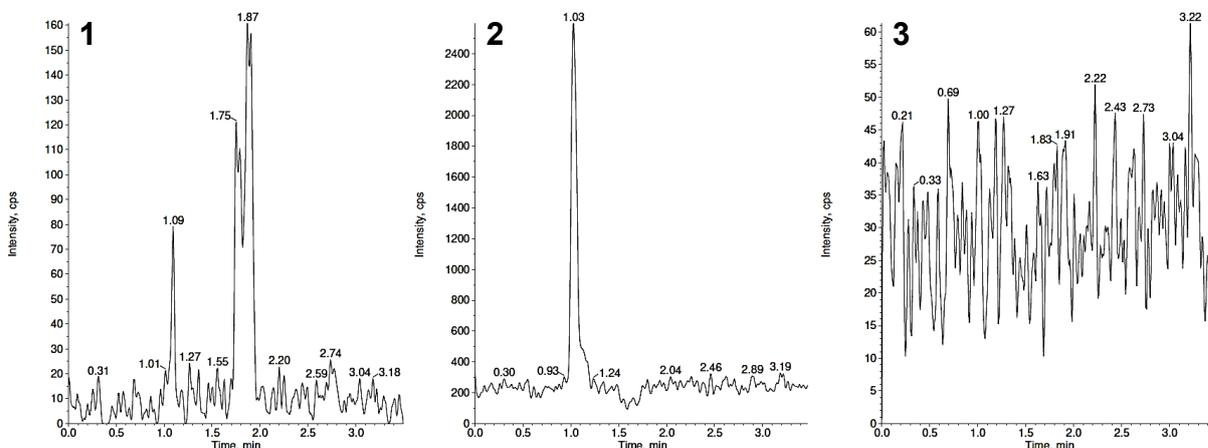
Posto isso, brancos de matriz biológica foram extraídos conforme protocolos definidos em 4.1.6 e então avaliados quanto à presença de picos interferentes. As figuras 46 a 48 a seguir exemplificam os cromatogramas obtidos, que fornecem informações preliminares sobre a ausência de coeluição de compostos endógenos nos tempos de retenção ( $t_r$ ) dos analitos e padrões internos, sinalizando ausência de interferência nas metodologias.

Figura 46 - Branco de plasma - (1): sofosbuvir ( $t_r = 1,16$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 0,69$  min); (3): PI (cimetidina,  $t_r = 0,50$  min)



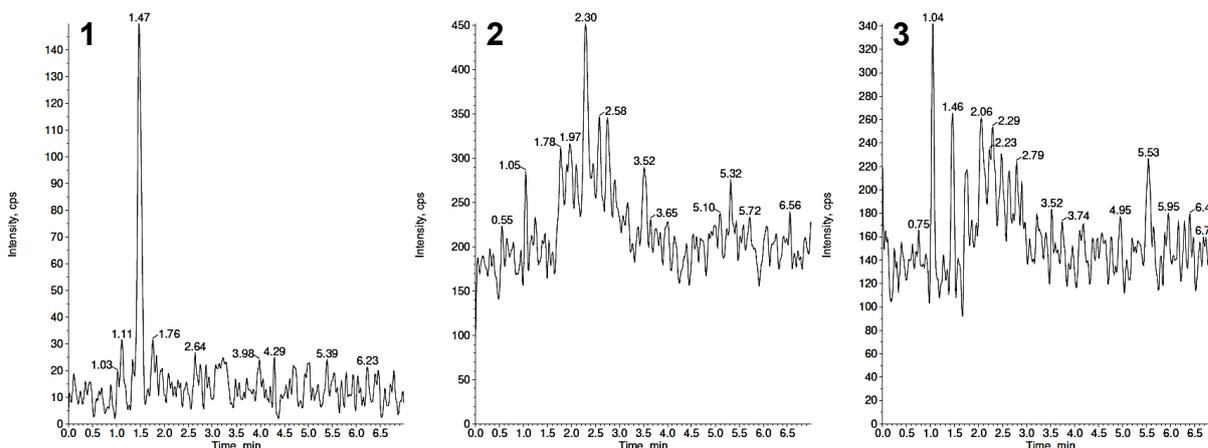
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 47 - Branco de líquido - (1): sofosbuvir ( $t_r = 2,77$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,75$  min); (3): PI (zidovudina,  $t_r = 2,00$  min)



Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 48 - Branco de fluido seminal - (1): sofosbuvir ( $t_r = 3,34$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,82$  min); (3): PI (diazepam,  $t_r = 5,99$  min).



Fonte: (Do autor, 2022).

Na avaliação preliminar do efeito matriz, que também pode comprometer a qualidade analítica dos resultados, a matriz branca foi extraída e em seguida fortificada com concentrações conhecidas dos analitos e padrão interno, resultando em amostras fortificadas após a extração (FD). Elas foram confrontadas com amostras de concentração equivalente, mas em solução, sendo, portanto, isentas dos componentes da matriz biológica. Não foi observada variação entre as respostas das amostras analisadas, indicando ausência de efeito matriz nas condições estabelecidas.

Visando avaliar a possibilidade de perturbação dos interferentes potenciais (nicotina e cafeína) nas metodologias, os testes descritos nos parágrafos anteriores, ou seja, teste de seletividade e efeito matriz, foram novamente realizados, mas na presença desses interferentes. Os experimentos sinalizaram que a cafeína e a nicotina não geram interferências nas metodologias desenvolvidas, conforme demonstrado posteriormente pelos resultados dos ensaios de validação descritos nas seções 4.2.1 e 4.2.2.

Visando prevenir a contaminação cruzada entre as injeções, testes foram realizados para definir o melhor solvente de lavagem do sistema cromatográfico. O melhor resultado (ausência de efeito de arraste) foi obtido com metanol puro, que, então, foi adotado como solvente de lavagem do sistema cromatográfico

Adicionalmente, ainda no decorrer do desenvolvimento, foi realizada uma investigação preliminar de controles de qualidade em matriz, inclusive controles de qualidade de diluição. Eles foram avaliados quanto à precisão e exatidão, obtendo-se resultados precisos e exatos (coeficiente de variação menor ou igual a 15 % e exatidão entre 85 e 115 %).

Por fim, os testes preliminares proporcionaram evidências suficientes de que as metodologias desenvolvidas já poderiam seguir para as próximas etapas, conforme apresentado nas seções subsequentes.

#### 4.1.8 Estabelecimento do limite inferior de quantificação (LIQ)

Para a realização dos ensaios, soluções de trabalho (concentrações conhecidas) foram adicionadas na matriz branca, resultando nas amostras em matriz biológica fortificadas com os analitos em concentrações conhecidas. Devido à baixa disponibilidade de matriz branca de líquor e fluido seminal, foi necessário o emprego de um pequeno volume de amostra, sendo adotado o volume de 50 µL, ao passo que, para o plasma, o volume de 100 µL foi utilizado. Em seguida, as amostras preparadas (0,10 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,50 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL, 5 ng/mL e 10 ng/mL) foram extraídas segundo procedimento de extração previamente desenvolvido (4.1.6).

Os testes revelaram que, para o sofobuvir, a precisão e exatidão de concentrações inferiores a 0,50 ng/mL não atendia aos critérios definidos pela legislação da ANVISA (2012). Para o metabólito GS-331007, a menor concentração

que obedeceu aos requisitos da legislação foi de 2, 5 e 10 ng/mL na matriz plasma, líquido e fluido seminal, respectivamente. Dessa maneira, os seguintes valores de limite inferior de quantificação foram estabelecidos para as metodologias:

- **plasma:** sofosbuvir = 0,50 ng/mL; GS-331007 = 2 ng/mL
- **líquor:** sofosbuvir = 0,50 ng/mL; GS-331007 = 5 ng/mL
- **fluido seminal:** sofosbuvir = 0,50 ng/mL; GS-331007 = 10 ng/mL

Os resultados dos ensaios realizados são apresentados nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13 - Sofosbuvir em plasma, líquido e fluido seminal - LIQ: CV e exatidão

<b>Matriz</b>	<b>Conc. nominal (ng/mL)</b>	<b>Conc. média (ng/mL)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
Plasma (n = 24)	0,50	0,52	15,10	104,68
LCR (n = 15)	0,50	0,51	6,29	101,18
FS (n = 15)	0,50	0,52	7,14	103,76

Fonte: (Do autor, 2022).

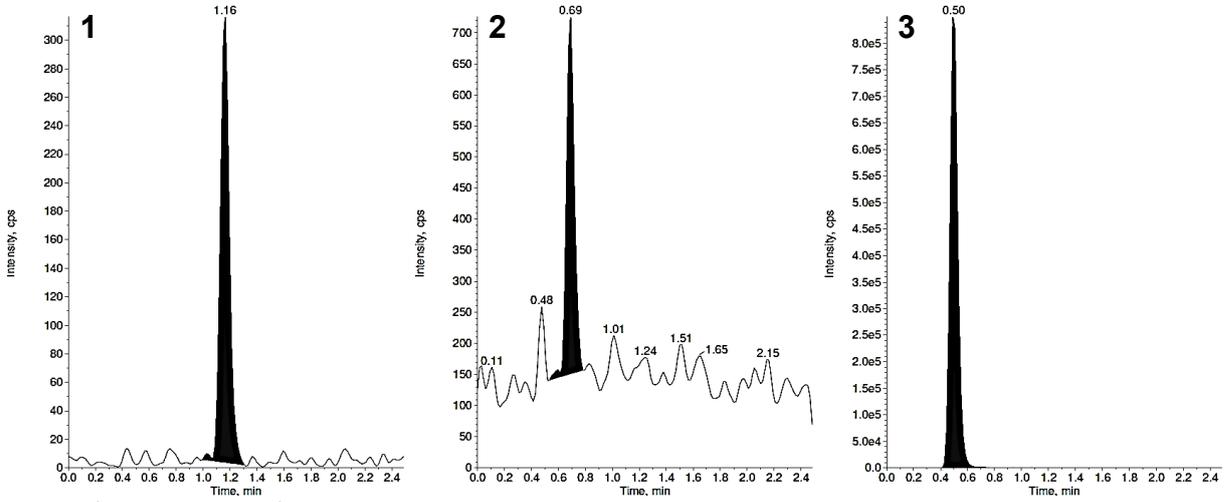
Tabela 14 - GS-331007 em plasma, líquido e fluido seminal - LIQ: CV e exatidão

<b>Matriz</b>	<b>Conc. nominal (ng/mL)</b>	<b>Conc. média (ng/mL)</b>	<b>CV (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
Plasma (n = 24)	2,00	1,94	14,70	97,09
LCR (n = 15)	5,00	5,24	9,05	104,88
FS (n = 15)	10,00	9,55	6,78	95,48

Fonte: (Do autor, 2022).

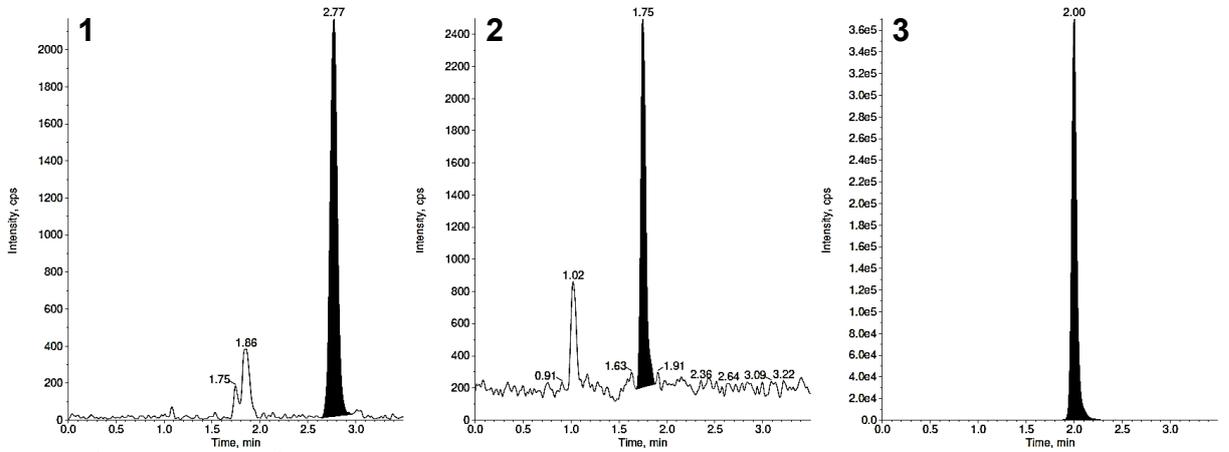
As figuras 49 a 51 a seguir apresentam cromatogramas dos LIQ's obtidos nos experimentos realizados.

Figura 49 - LIQ em plasma (ng/mL) sofosbuvir = 0,50; GS-331007 = 2,00 - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (cimetidina)



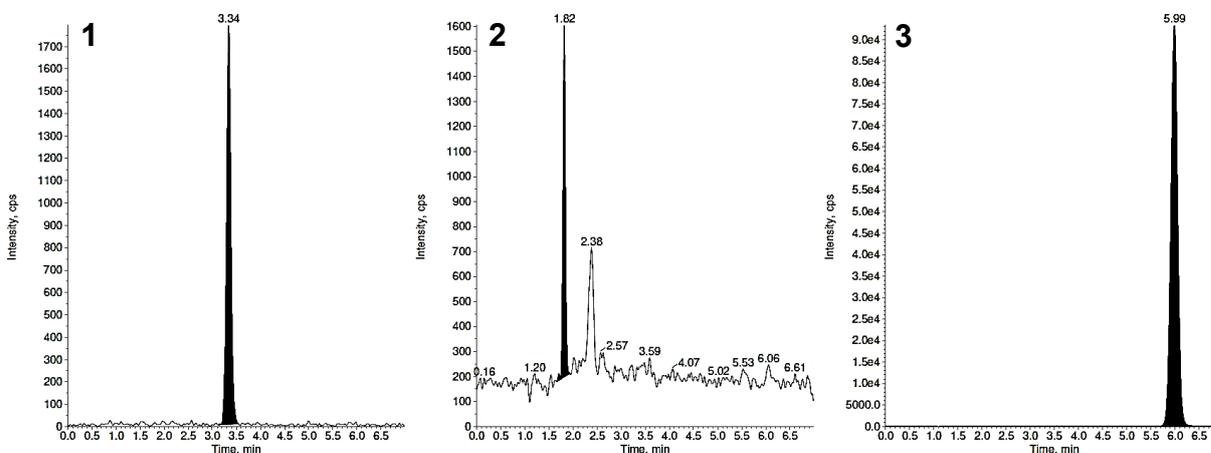
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 50 - LIQ em líquido (ng/mL) sofosbuvir = 0,50; GS-331007 = 5,00 - (1): sofosbuvir; (2): GS-331007; (3): PI (zidovudina)



Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 51 - LIQ em Fluido seminal (ng/mL) sofobuvir = 0,50; GS-331007 = 10,00 - (1): sofobuvir; (2): GS-331007; (3): PI (diazepam)



Fonte: (Do autor, 2022).

O LIQ obtido para o sofobuvir foi o mesmo em todas as matrizes biológicas empregadas neste trabalho. O valor encontrado foi maior apenas do que o LIQ determinado pelos autores Abdallah, Abdel-Megied e Gouda (2017), que foi de 0,30 ng/mL. Assim, pode-se dizer que as metodologias apresentaram alta sensibilidade para a determinação de sofobuvir nas matrizes biológicas em estudo.

O metabólito GS-331007, por sua vez, apresentou o melhor resultado na matriz plasma (2 ng/mL). A propósito, o sinal cromatográfico do metabólito foi menor em líquido e fluido seminal quando comparados ao plasma. Uma possível explicação para tal diferença reside no fato de que as matrizes biológicas, devido à alta complexidade, possuem características particulares que podem influenciar na resposta e, conseqüentemente, no limite inferior de quantificação. Esse entendimento vai ao encontro do descrito na literatura científica por Cortese e colaboradores (2020).

Merece ser destacado, por oportuno, que, durante a investigação dos parâmetros do espectrômetro de massas, o metabólito exibiu menor sensibilidade quando contrastado ao sofobuvir. Conseqüentemente, revelou menor intensidade de sinal (figuras 22 e 23), o que refletiu no valor de limite inferior de quantificação encontrado.

Contudo, em comparação aos estudos da literatura, o LIQ obtido para o metabólito na matriz plasma (2,00 ng/mL) exibiu uma das mais altas sensibilidades, igualando-se apenas ao encontrado no trabalho dos autores Shen e colaboradores (2019). Com relação ao LIQ encontrado nas matrizes líquido (5,00 ng/mL) e fluido

seminal (10,00 ng/mL), não é possível estabelecer uma comparação, pois não há estudos publicados acerca da determinação de GS-331007 nessas matrizes.

Portanto, pode-se afirmar que as metodologias desenvolvidas apresentam alta sensibilidade, sendo, inclusive, mais sensíveis do que a maioria das metodologias de quantificação simultânea de sofosbuvir e seu metabólito GS-331007 em matrizes biológicas. Além disso, elas propiciaram o emprego de um pequeno volume de matriz biológica para cada amostra analisada, isto é, apenas 100 µL de plasma e 50 µL de líquido ou fluido seminal.

Finalmente, ainda merece ser ressaltado que os valores encontrados para o limite inferior de quantificação estão de acordo com o recomendado pelos autores Kadian e colaboradores (2016), isto é, foram menores do que 10 % da concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ) do sofosbuvir e do metabólito GS-331007 (vide tabela 1). Assim, os limites encontrados permitiram sua utilização como o menor ponto da curva analítica empregada na validação e quantificação das amostras clínicas.

#### 4.1.9 Delineamento da curva de calibração

Em plasma, a faixa de linearidade inicialmente proposta para o estudo (0,10 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL, 800 ng/mL, 1600 ng/mL e 2000 ng/mL) foi parcialmente aprovada, pois o LIQ estabelecido para o sofosbuvir e para o metabólito foi de 0,50 ng/mL e 2,00 ng/mL, respectivamente. Além disso, o segundo ponto da curva (10 ng/mL) foi substituído por um ponto de concentração igual a 1,50 ng/mL para o sofosbuvir e 5,00 ng/mL para o metabólito GS-331007. Quanto ao LSQ, ressalta-se que a concentração estabelecida foi adequada e não provocou saturação de sinal nem problemas relacionados ao efeito de arraste.

Em relação ao líquido e o fluido seminal, a curva proposta precisou ser alterada, pois foi constatado, a partir de análise preliminar, que a concentração dos analitos apresentava-se inferior à concentração plasmática nas amostras clínicas analisadas. Sendo assim, a abrangência e o LSQ da curva foram reduzidos.

Em suma, diferentes curvas analíticas foram propostas para as matrizes em exame, sendo a curva em plasma constituída por 8 níveis de concentração e 7 níveis para o líquido e fluido seminal, conforme apresentado nas tabelas 15 e 16 a seguir.

Tabela 15 - Sofosbuvir - curva em plasma, líquido e fluido seminal

Matriz	Sofosbuvir (ng/mL)							
	1(LIQ)	2	3	4	5	6	7	8(LSQ)
Plasma	0,50	1,50	100,00	200,00	400,00	800,00	1600,00	2000,00
LCR	0,50	1,50	10,00	20,00	40,00	80,00	100,00	-
FS	0,50	1,50	10,00	20,00	40,00	80,00	100,00	-

Fonte: (Do autor, 2022).

Tabela 16 - GS-331007 - curva em plasma, líquido e fluido seminal

Matriz	GS-331007 (ng/mL)							
	1 (LIQ)	2	3	4	5	6	7	8(LSQ)
Plasma	2,00	5,00	100,00	200,00	400,00	800,00	1600,00	2000,00
LCR	5,00	10,00	25,00	50,00	75,00	150,00	200,00	-
FS	10,00	25,00	100,00	300,00	600,00	1200,00	1500,00	-

Fonte: (Do autor, 2022).

Posteriormente ao preparo dos pontos da curva, foi realizado o procedimento de extração líquido-líquido, conforme definido em 4.1.6. Em seguida as amostras foram injetadas no sistema LC-MS/MS.

As curvas analisadas mostraram proporcionalidade de resposta e coeficiente de correlação ( $r$ ) maior ou igual a 0,99, sinalizando ausência de desvio de linearidade. Foi constatado que fator de ponderação  $1/x^2$  gerou menor variação e erro percentual, sendo, portanto, o fator aplicado nas curvas deste estudo.

Comparando as curvas propostas para este estudo com publicações da literatura sobre a determinação de sofosbuvir e GS-331007 em plasma humano, foi observado que todas elas possuem um amplo intervalo de concentração (REZK; BASALIOUS; KARIM, 2015; ARIAUDO et al., 2016; ABDALLAH; ABDEL-MEGIED; GOUDA, 2017; NOTARI et al., 2018; SEMREEN et al., 2019; SHEN et al., 2019; SEYEN et al., 2019; FERRARI et al., 2019). Aliás, considerando a alta variabilidade dos estudos com sistemas biológicos, é fundamental que esse intervalo seja amplo,

pois permite a quantificação confiável de amostras clínicas das mais variadas concentrações.

#### 4.1.10 Delineamento dos níveis de concentração dos controles de qualidade

Os valores inicialmente propostos para a concentração dos controles precisaram ser modificados em virtude dos resultados obtidos em cada matriz. Para avaliar o processo de diluição, as amostras de CQD em plasma foram diluídas 4 vezes, enquanto as amostras de CQD em líquido e fluido seminal foram diluídas 5 vezes. Posto isso, os seguintes controles de qualidade foram definidos, conforme apresentado nas tabelas 17 e 18.

Tabela 17 - Sofosbuvir - controles em plasma, líquido e fluido seminal

Matriz	Sofosbuvir (ng/mL)			
	CQB	CQM	CQA	CQD
Plasma	1,50	800,00	1600,00	6400,00
LCR	1,50	40,00	80,00	400,00
FS	1,50	40,00	80,00	400,00

Fonte: (Do autor, 2022).

Tabela 18 - GS-331007 - controles em plasma, líquido e fluido seminal

Matriz	GS-331007 (ng/mL)			
	CQB	CQM	CQA	CQD
Plasma	5,00	800,00	1600,00	6400,00
LCR	10,00	75,00	150,00	750,00
FS	25,00	600,00	1200,00	6000,00

Fonte: (Do autor, 2022).

Finalmente, a partir deste ponto, foi possível seguir para a execução dos ensaios de validação preconizados pela legislação.

## 4.2 Validação de metodologias bioanalíticas

Após o desenvolvimento das metodologias bioanalíticas, foi realizado todo o protocolo de validação, permitindo a obtenção de resultados quantitativos confiáveis. Os parâmetros presentes na legislação da ANVISA foram utilizados como referência. Vale apontar que a legislação não prevê a realização de validação parcial e que o protocolo completo foi realizado individualmente para cada matriz (plasma, líquido e fluido seminal).

### 4.2.1 Seletividade

Amostras extraídas de branco da matriz biológica foram comparadas com amostras extraídas de limite inferior de quantificação, não sendo observada resposta cromatográfica nos brancos analisados nos tempos de retenção dos analitos e padrões internos. A comparação consistiu no cálculo da razão (% interferência) entre a área observada no branco e a área do analito e padrão interno na amostra de menor concentração da curva de calibração, ou seja, limite inferior de quantificação.

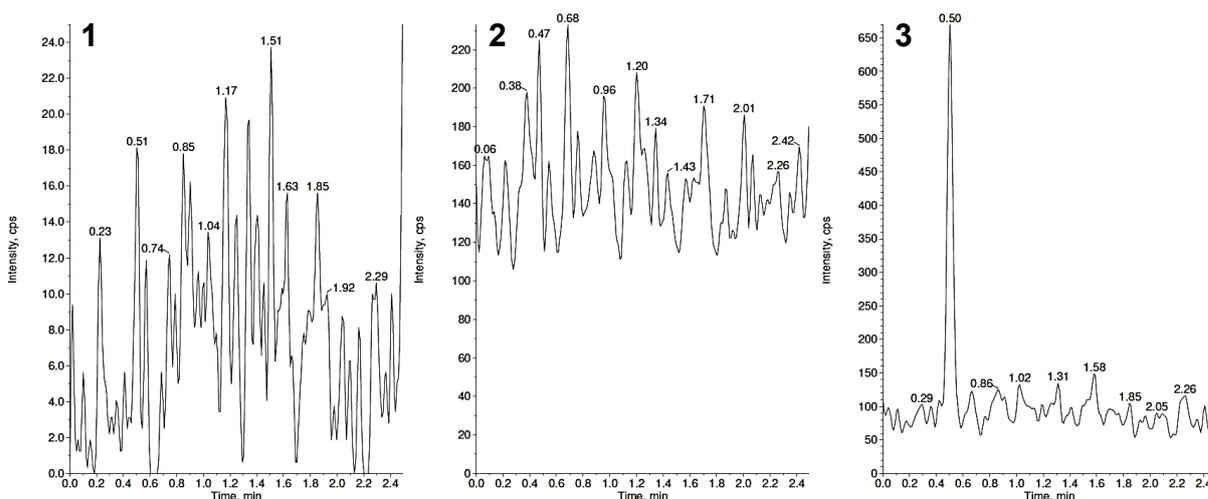
Diante dos resultados, pode-se dizer que não houve interferência significativa (até 20 % da área do analito no LIQ e até 5 % da área do padrão interno) nos tempos de retenção dos analitos e padrões internos, isto é, não houve coeluição de possíveis interferentes. Portanto, as metodologias bioanalíticas desenvolvidas apresentam a capacidade de distinguir entre as substâncias analisadas e todos os outros componentes das matrizes analisadas, sejam impurezas, metabólitos, compostos endógenos e os potenciais interferentes nicotina e cafeína. Além disso, as metodologias apresentaram performance adequada, mesmo em matrizes com alto teor de lipídeos (lipêmicas) e hemoglobina (hemolisadas).

Em conclusão, a alta seletividade foi assegurada pelos seguintes elementos estabelecidos durante o desenvolvimento das metodologias: parâmetros do espectrômetro de massas, método cromatográfico e processamento/extração das amostras. Além disso, esse ensaio demonstrou que as transições iônicas (íon precursor > íon produto) previamente selecionadas exibiram a seletividade exigida para a análise de matrizes complexas tais como as biológicas.

#### 4.2.1.1 Seletividade em plasma

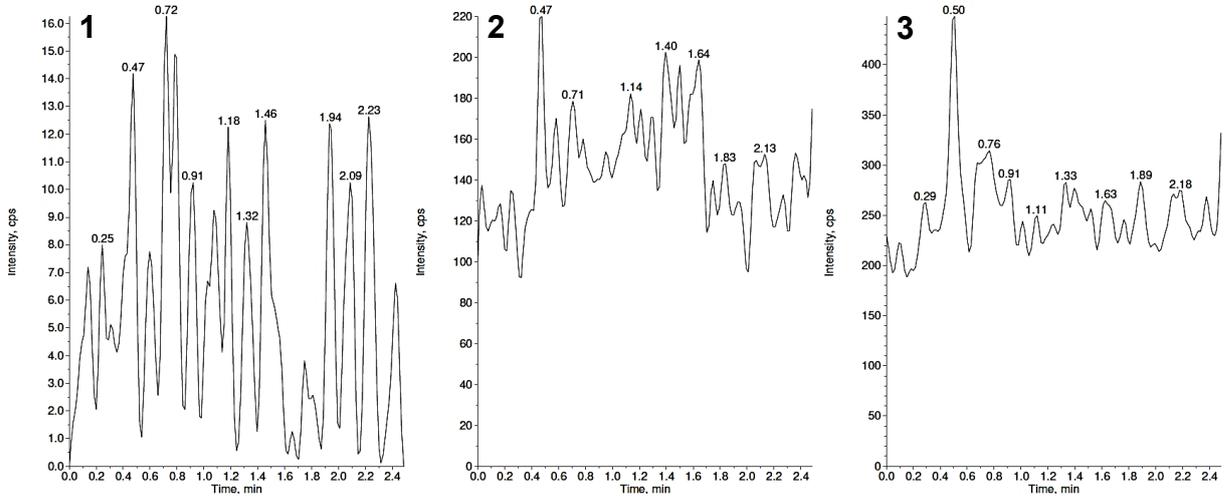
Não foi observada interferência da matriz nas condições estabelecidas. As figuras 52 a 57 apresentam os cromatogramas de amostras extraídas de brancos da matriz biológica de diversas origens (indivíduos) com diferentes características (normal, lipêmico e hemolisado). A tabela 19 apresenta as áreas obtidas das amostras extraídas de limite inferior de quantificação (sofosbuvir = 0,50 ng/mL e GS-331007 = 2 ng/mL) preparados com as matrizes em exame e os percentuais de interferência nos tempos de retenção do sofosbuvir (SFB), GS-31007 e cimetidina (padrão interno - PI).

Figura 52 - Branco de plasma normal 1 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 1,16$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 0,69$  min); (3): PI (cimetidina,  $t_r = 0,50$  min)



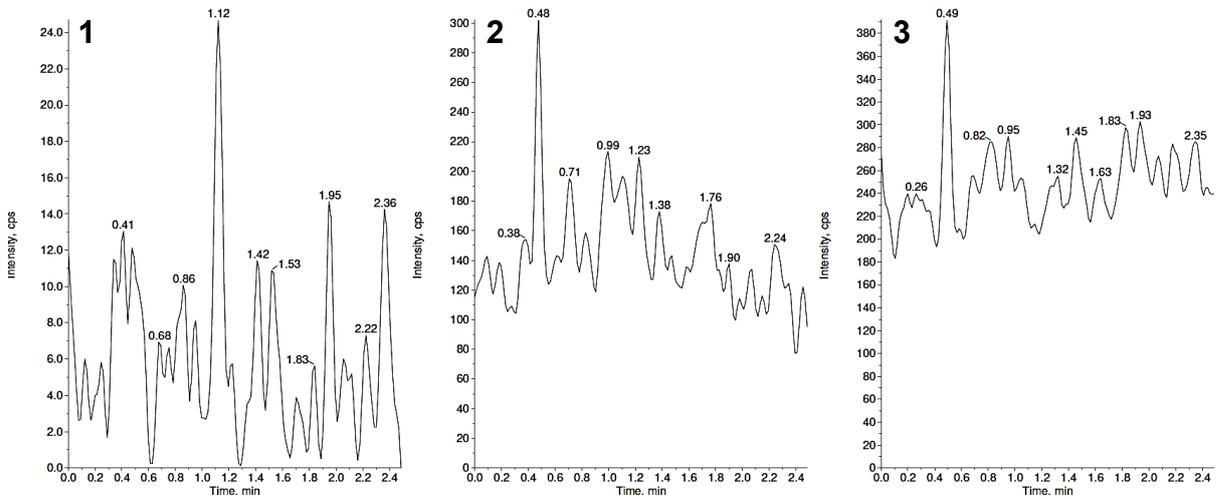
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 53 - Branco de plasma normal 2 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 1,16$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 0,69$  min); (3): PI (cimetidina,  $t_r = 0,50$  min)



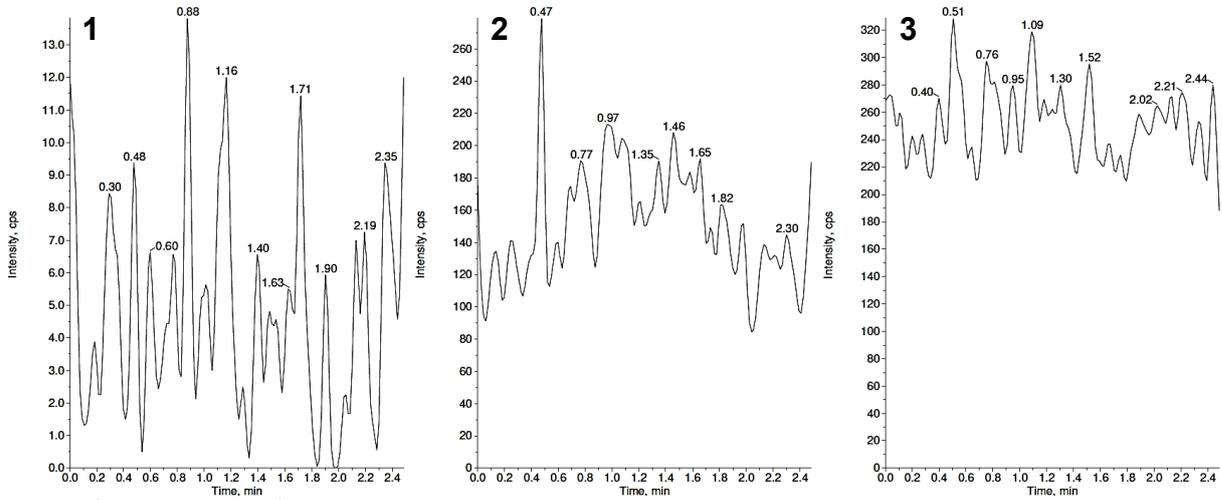
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 54 - Branco de plasma normal 3 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 1,16$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 0,69$  min); (3): PI (cimetidina,  $t_r = 0,50$  min)



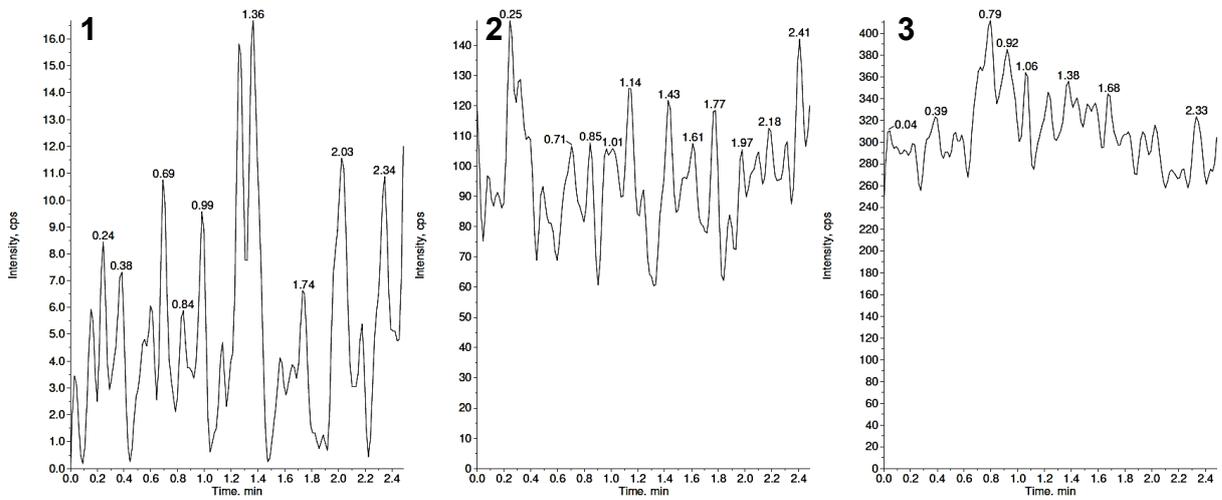
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 55 - Branco de plasma normal 4 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 1,16$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 0,69$  min); (3): PI (cimetidina,  $t_r = 0,50$  min)



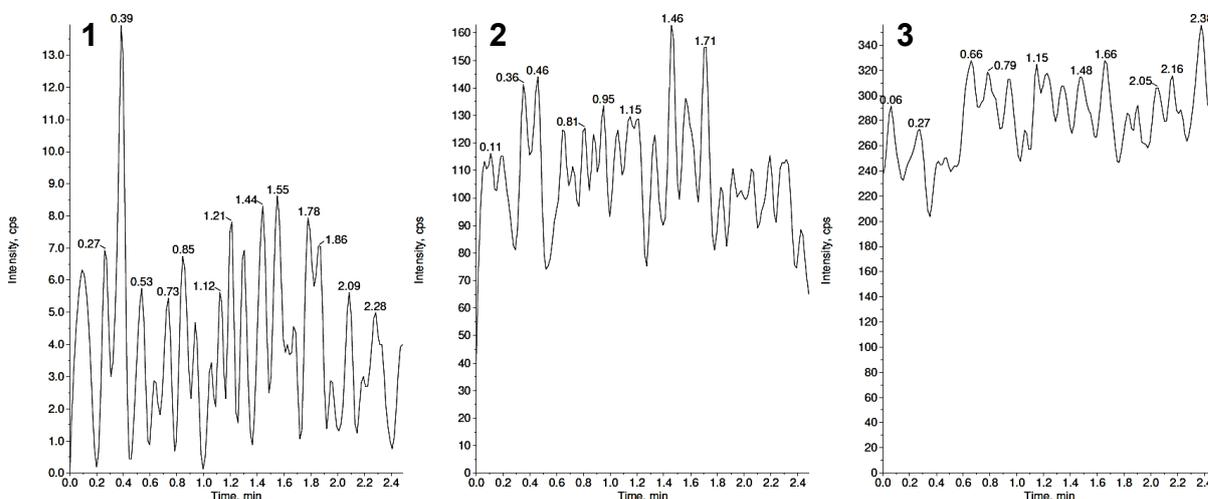
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 56 - Branco de plasma lipêmico 5 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 1,16$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 0,69$  min); (3): PI (cimetidina,  $t_r = 0,50$  min)



Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 57 - Branco de plasma hemolisado 6 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 1,16$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 0,69$  min); (3): PI (cimetidina,  $t_r = 0,50$  min)



Fonte: (Do autor, 2022).

Tabela 19 - Plasma - Área e (%) interferência

Matriz	Área - LIQ			(% Interferência)		
	SFB	GS-331007	PI (Cimetidina)	SFB	GS-331007	PI
Normal 1	1487,87	2360,83	3480557,08	0	0	0
Normal 2	1329,17	2943,46	3553427,94	0	0	0
Normal 3	1348,83	2612,59	3697658,77	0	0	0
Normal 4	1497,47	2630,41	3759845,01	0	0	0
Lipêmica	1525,90	2795,87	3447771,76	0	0	0
Hemolisada	1647,89	2274,05	3613273,82	0	0	0

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.1.1.1 Seletividade em plasma com potenciais interferentes

A nicotina e a cafeína não ocasionaram interferência adicional nas amostras de branco de matriz avaliadas, uma vez que elas não apresentaram picos interferentes nos tempos de retenção das substâncias de interesse (analitos e padrão interno). A tabela 20 apresenta as áreas obtidas das amostras extraídas de limite inferior de quantificação (sofosbuvir = 0,50 ng/mL e GS-331007 = 2 ng/mL) preparadas com as matrizes em estudo e os percentuais de interferência nos tempos de retenção do sofosbuvir (SFB), GS-331007 e cimetidina (padrão interno - PI).

Tabela 20 - Plasma com interferentes - Área e (%) interferência

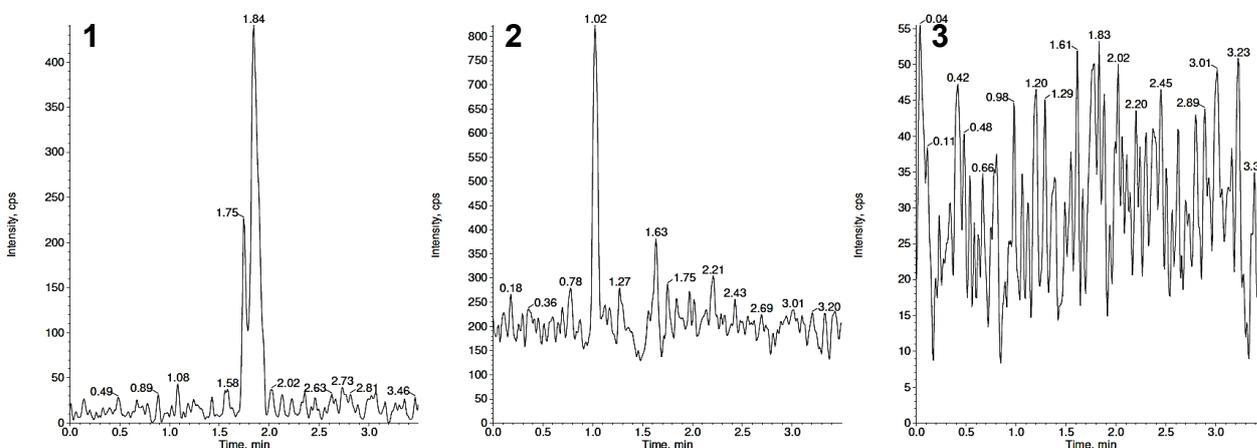
Matriz	Área - LIQ			(%) Interferência		
	SFB	GS-331007	PI (Cimetidina)	SFB	GS-331007	PI
Normal 1	1568,60	2742,35	3244519,01	0	0	0
Normal 2	1226,30	2384,96	3406781,26	0	0	0
Normal 3	1347,97	2489,71	3565454,93	0	0	0
Normal 4	1175,18	1879,02	3156093,19	0	0	0
Lipêmica	1050,58	2309,89	3529767,85	0	0	0
Hemolisada	1288,81	2951,97	3378057,42	0	0	0

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.1.2 Seletividade em líquido

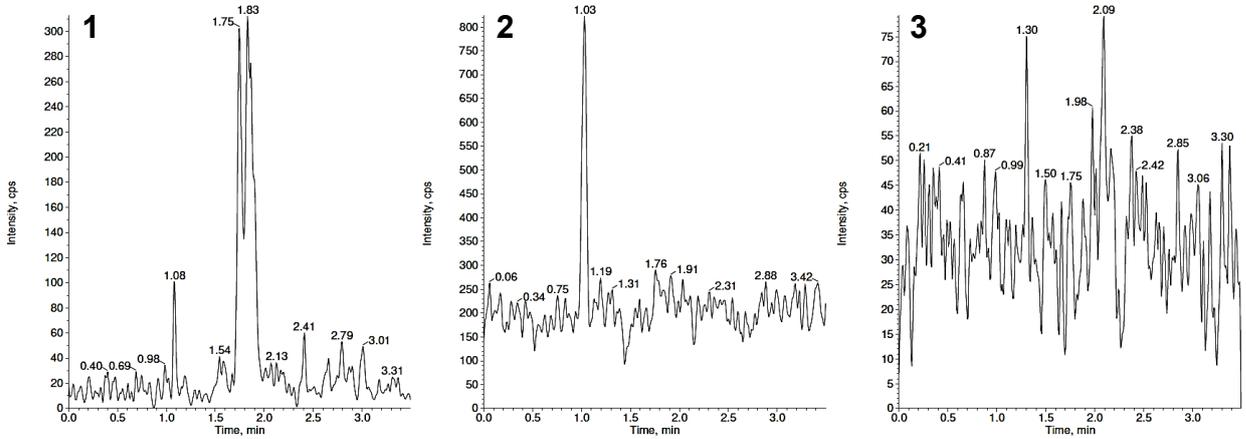
Não foi observada interferência de substâncias endógenas nas condições estabelecidas. As figuras 58 a 63 apresentam os cromatogramas de amostras extraídas de brancos da matriz biológica de fontes distintas (diferentes indivíduos). A tabela 21 apresenta as áreas obtidas das amostras extraídas de limite inferior de quantificação (sofosbuvir = 0,50 ng/mL e GS-331007 = 5 ng/mL) preparadas com as matrizes em exame e os percentuais de interferência nos tempos de retenção do sofosbuvir (SFB), GS-31007 e zidovudina (padrão interno - PI).

Figura 58 - Branco de líquido 1 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 2,77$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,75$  min); (3): PI (zidovudina,  $t_r = 2,00$  min)



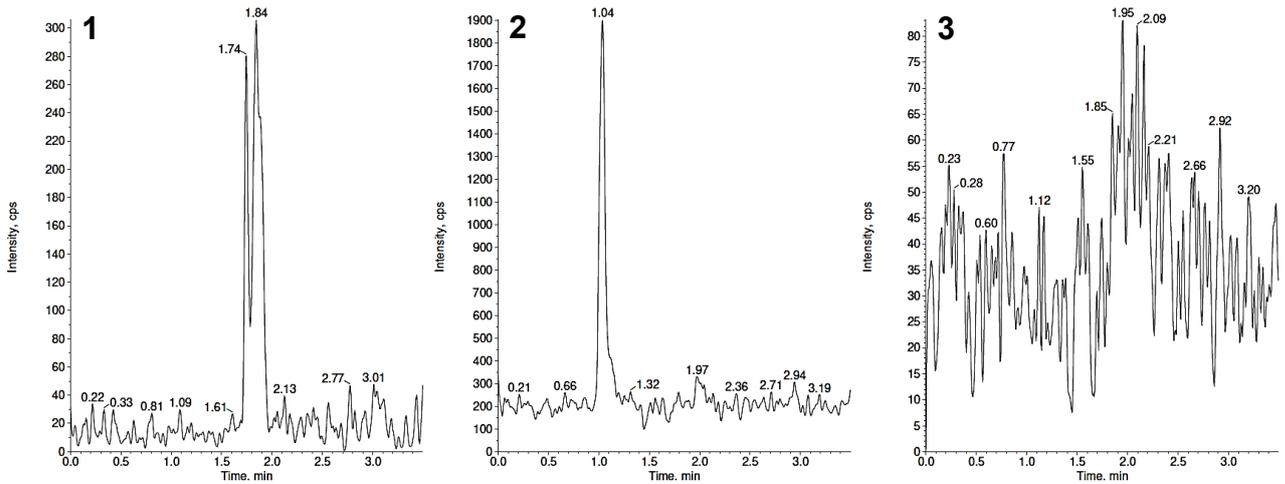
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 59 - Branco de líquor 2 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 2,77$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,75$  min); (3): PI (zidovudina,  $t_r = 2,00$  min)



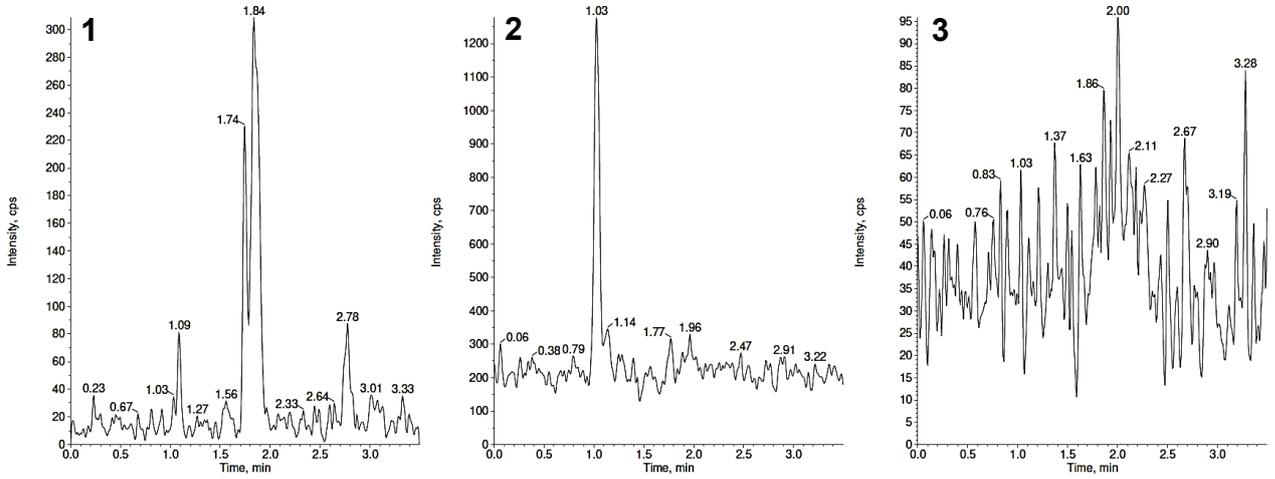
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 60 - Branco de líquor 3 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 2,77$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,75$  min); (3): PI (zidovudina,  $t_r = 2,00$  min)



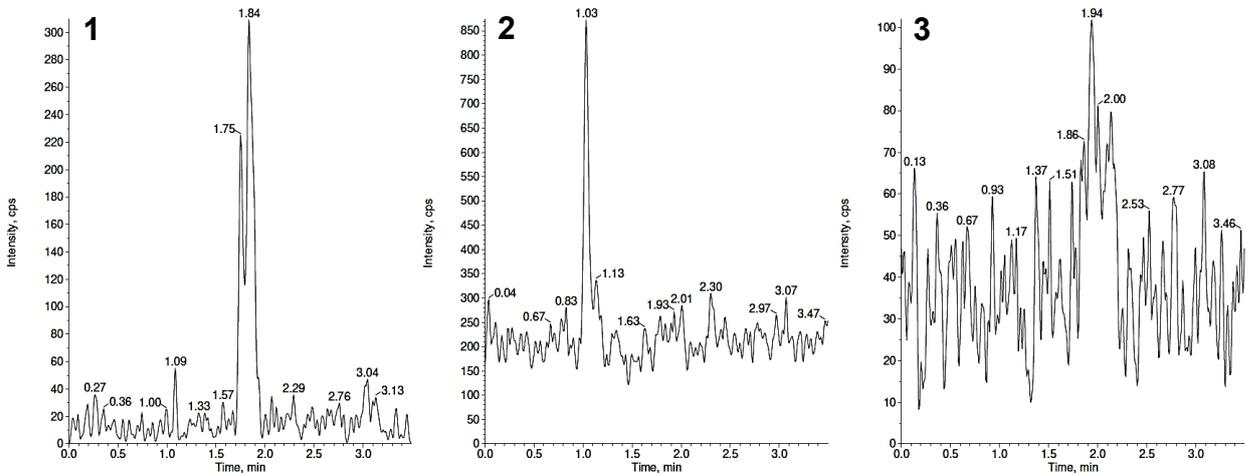
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 61 - Branco de líquido 4 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 2,77$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,75$  min); (3): PI (zidovudina,  $t_r = 2,00$  min)



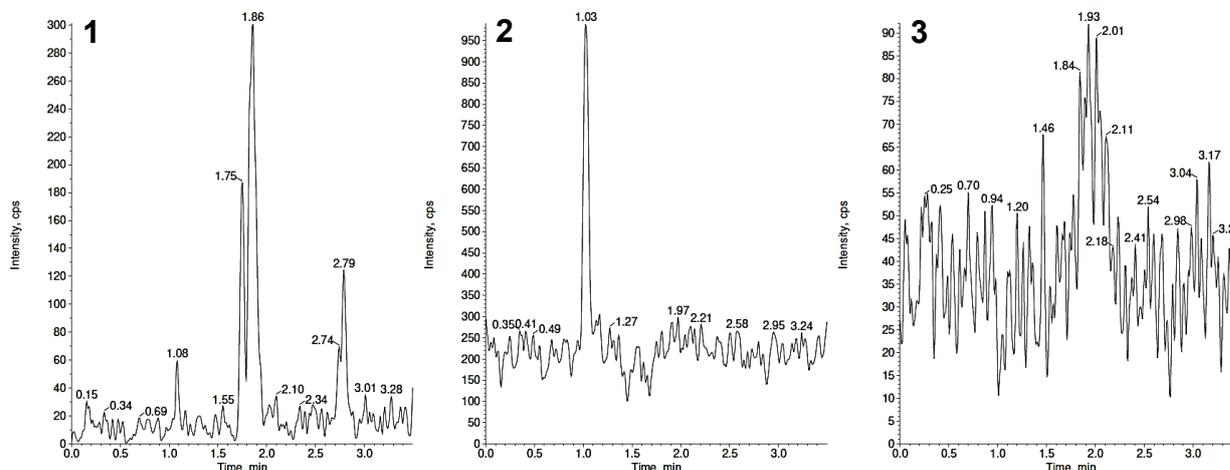
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 62 - Branco de líquido 5 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 2,77$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,75$  min); (3): PI (zidovudina,  $t_r = 2,00$  min)



Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 63 - Branco de líquido 6 - (1): sofobuvir ( $t_r = 2,77$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,75$  min); (3): PI (zidovudina,  $t_r = 2,00$  min)



Fonte: (Do autor, 2022).

Tabela 21 - Líquor - Área e (%) interferência

Matriz	Área - LIQ			(% Interferência)		
	SFB	GS-331007	PI (Zidovudina)	SFB	GS-331007	PI
1	11234,21	8689,64	1404420,05	0	0	0
2	10719,59	8381,64	1445822,93	0	0	0
3	10808,06	8375,76	1485027,97	0	0	0
4	11609,26	9404,86	1396102,41	0	0	0
5	11892,32	8823,76	1400144,29	0	0	0
6	11144,15	8754,39	1515298,57	0	0	0

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.1.2.1 Seletividade em líquido com potenciais interferentes

A nicotina e a cafeína não ocasionaram interferência nas amostras de branco de matriz avaliadas, uma vez que elas não apresentaram picos interferentes nos tempos de retenção das substâncias de interesse (analitos e padrão interno). A tabela 22 apresenta as áreas obtidas das amostras extraídas de limite inferior de quantificação (sofobuvir = 0,50 ng/mL e GS-331007 = 5 ng/mL) preparadas com as matrizes em estudo e os percentuais de interferência nos tempos de retenção do sofobuvir (SFB), GS-31007 e zidovudina (padrão interno - PI).

Tabela 22 - Líquor com interferentes - Área e (%) interferência

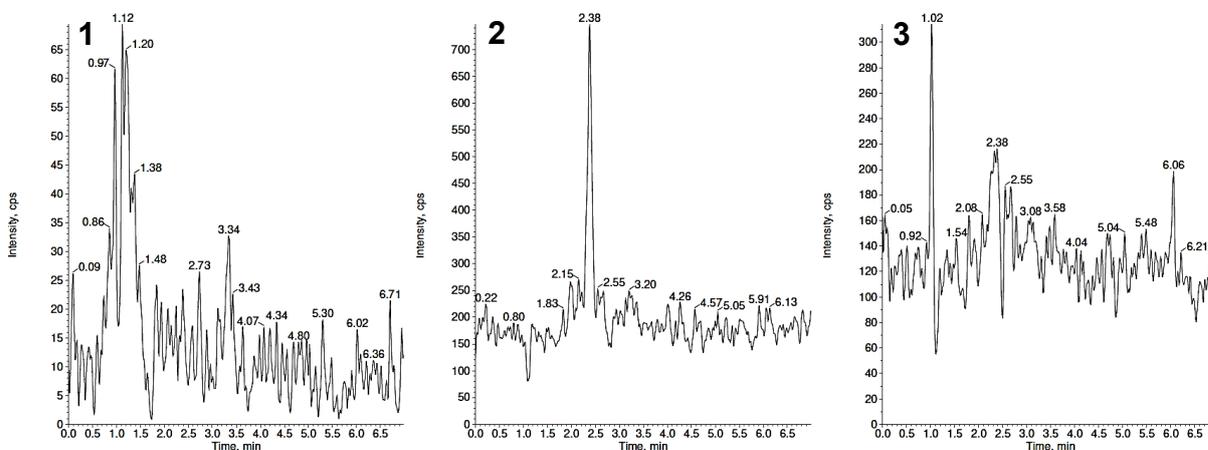
Matriz	Área - LIQ			(%) Interferência		
	SFB	GS-331007	PI (Zidovudina)	SFB	GS-331007	PI
1	11587,21	10387,34	1662506,82	0	0	0
2	11861,71	9588,85	1647758,53	0	0	0
3	12355,59	9229,00	1653406,58	0	0	0
4	12234,65	9742,28	1743631,62	0	0	0
5	12315,70	9335,67	1761086,14	0	0	0
6	10903,01	10802,76	1641564,23	0	0	0

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.1.3 Seletividade em fluido seminal

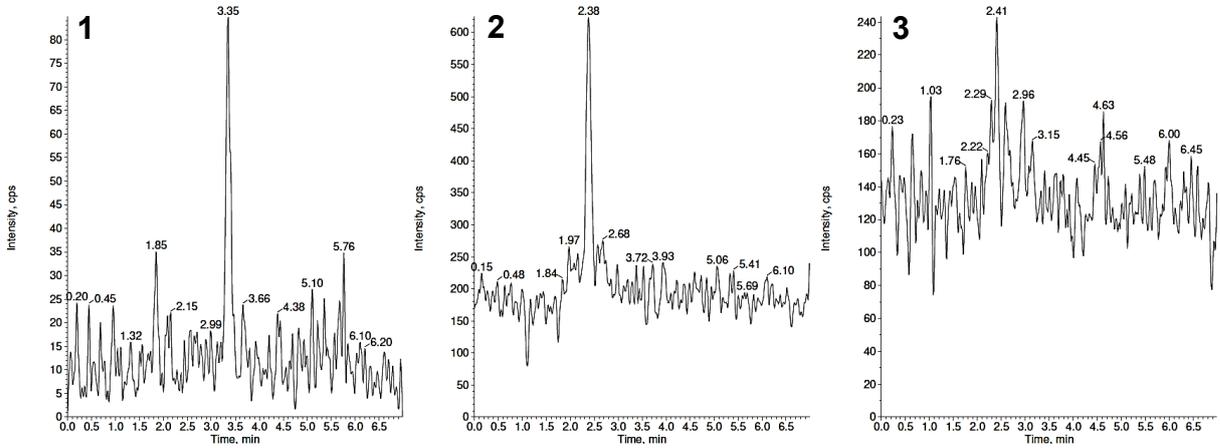
Não foi observada interferência de substâncias endógenas nas condições estabelecidas. As figuras 64 a 69 apresentam os cromatogramas de amostras extraídas de brancos da matriz biológica de fontes diferentes (indivíduos). A tabela 23 apresenta as áreas obtidas das amostras extraídas de limite inferior de quantificação (sofosbuvir = 0,50 ng/mL e GS-331007 = 10 ng/mL) preparadas com as matrizes em exame e os percentuais de interferência nos tempos de retenção do sofosbuvir (SFB), GS-31007 e diazepam (padrão interno - PI).

Figura 64 - Branco de fluido seminal 1 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 3,34$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,82$  min); (3): PI (diazepam,  $t_r = 5,99$  min)



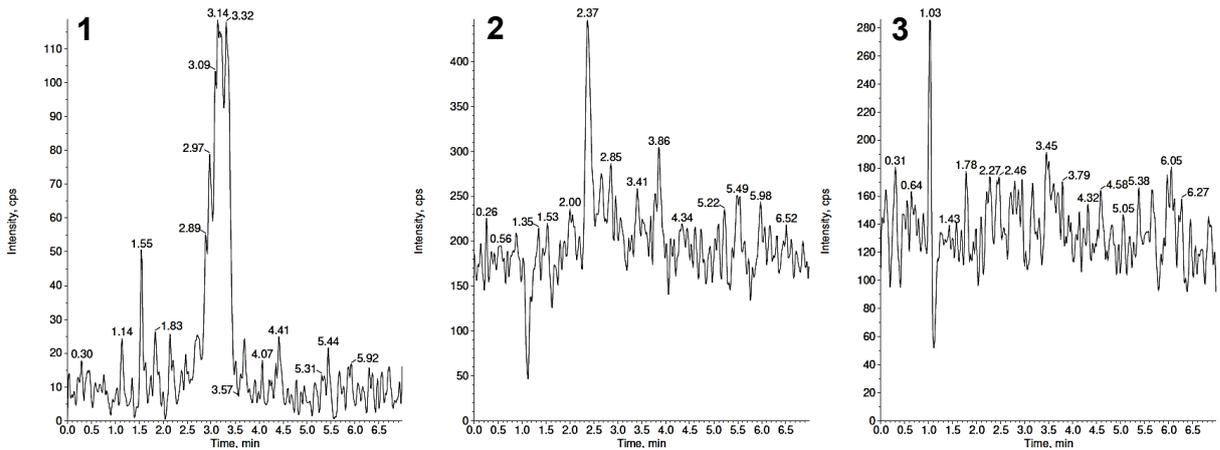
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 65 - Branco de fluido seminal 2 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 3,34$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,82$  min); (3): PI (diazepam,  $t_r = 5,99$  min)



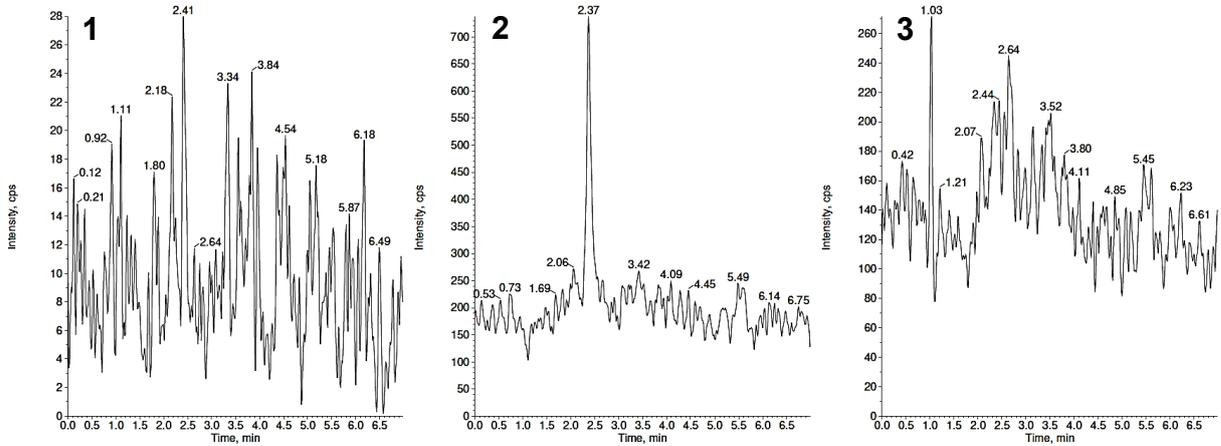
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 66 - Branco de fluido seminal 3 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 3,34$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,82$  min); (3): PI (diazepam,  $t_r = 5,99$  min)



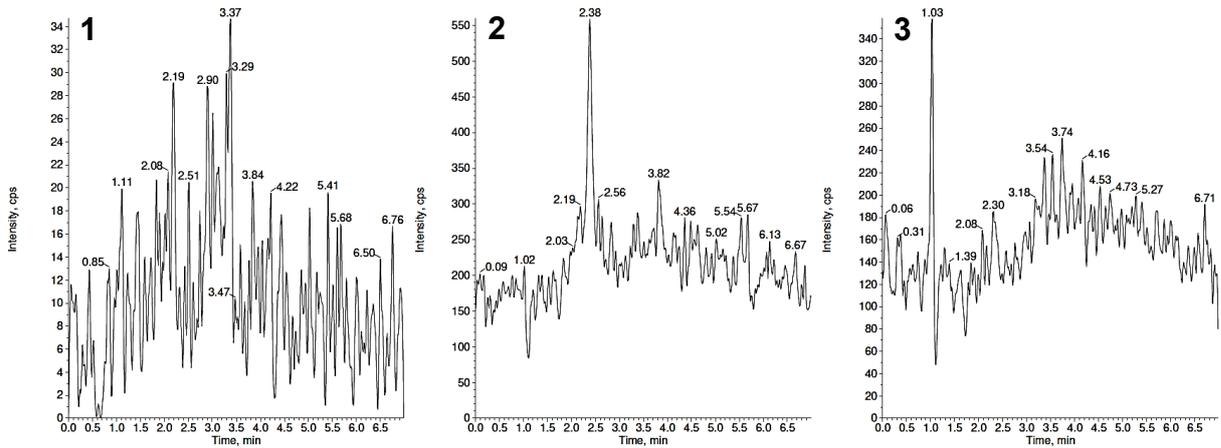
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 67 - Branco de fluido seminal 4 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 3,34$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,82$  min); (3): PI (diazepam,  $t_r = 5,99$  min)



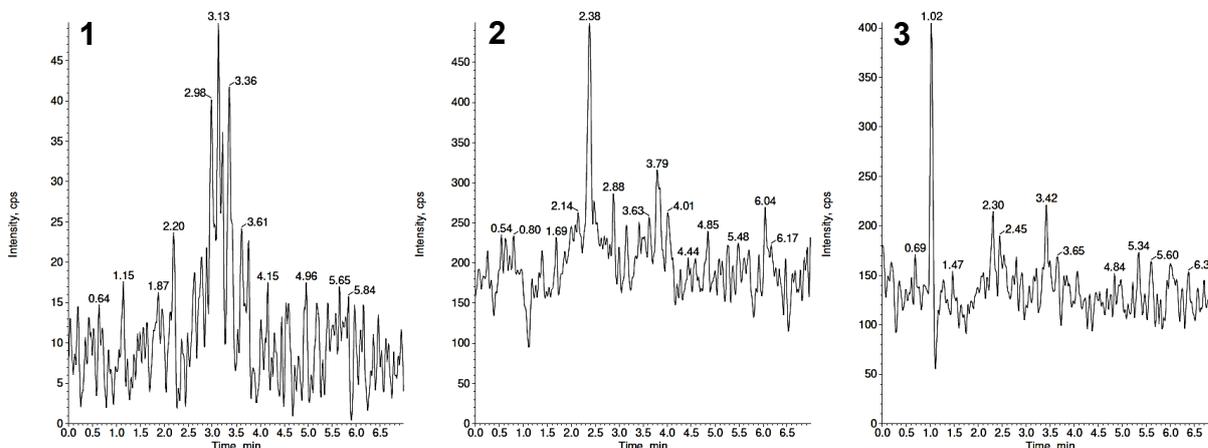
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 68 - Branco de fluido seminal 5 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 3,34$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,82$  min); (3): PI (diazepam,  $t_r = 5,99$  min)



Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 69 - Branco de fluido seminal 6 - (1): sofosbuvir ( $t_r = 3,34$  min); (2): GS-331007 ( $t_r = 1,82$  min); (3): PI (diazepam,  $t_r = 5,99$  min)



Fonte: (Do autor, 2022).

Tabela 23 - Fluido seminal - Área e (%) interferência

Matriz	Área - LIQ			(% Interferência)		
	SFB	GS-331007	PI (Diazepam)	SFB	GS-331007	PI
1	11496,58	5404,97	931375,02	0	0	0
2	11530,42	7047,51	890257,04	0	0	0
3	18842,65	6331,38	945191,04	0	0	0
4	10940,18	5542,52	1048001,47	0	0	0
5	10492,71	6101,07	888608,36	0	0	0
6	11271,77	5647,66	868099,90	0	0	0

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.1.3.1 Seletividade em fluido seminal com potenciais interferentes

A nicotina e a cafeína não ocasionaram interferência nas amostras de branco de matriz avaliadas, uma vez que elas não apresentaram picos interferentes nos tempos de retenção das substâncias de interesse (analitos e padrão interno). A tabela 24 apresenta as áreas obtidas das amostras extraídas de limite inferior de quantificação (sofosbuvir = 0,50 ng/mL e GS-331007 = 10 ng/mL) preparadas com as matrizes em estudo e os percentuais de interferência nos tempos de retenção do sofosbuvir (SFB), GS-31007 e diazepam (padrão interno - PI).

Tabela 24 - Fluido seminal com interferentes - Área e (%) interferência

Matriz	Área - LIQ			(% Interferência)		
	SFB	GS-331007	PI (Diazepam)	SFB	GS-331007	PI
1	15489,17	7354,44	1937350,47	0	0	0
2	7844,29	4698,89	1139143,67	0	0	0
3	13311,61	7865,54	1878586,71	0	0	0
4	13065,34	8844,31	1931486,47	0	0	0
5	13467,43	7215,69	1732737,94	0	0	0
6	13891,31	7659,69	1838244,88	0	0	0

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.2 Efeito matriz

Conforme preconizado pela legislação da ANVISA (2012), foi realizada a avaliação quantitativa do efeito matriz por meio do cálculo do fator de matriz normalizado (FMN), obtendo-se como resultado a ausência de efeito matriz significativo, uma vez que o coeficiente de variação (CV) dos FMN foi menor do que 15 %.

Assim sendo, pode-se concluir que os componentes das matrizes analisadas não provocaram aumento ou supressão de sinal, impacto este que poderia levar ao aumento da variação dos FMN e, por conseguinte, indicar a ocorrência de efeito matriz. Ademais, o referido impacto não foi observado nas matrizes de características lipêmicas e hemolisadas, tampouco na presença dos potenciais interferentes nicotina e cafeína. Novamente, o resultado encontrado reforça a qualidade das metodologias desenvolvidas e, em especial, do método de extração das amostras, que foi eficiente para garantir que a influência dos inúmeros componentes de matrizes complexas não prejudicasse a reprodutibilidade das quantificações.

##### 4.2.2.1 Efeito matriz em plasma

A matriz branca de 8 indivíduos (4 normais, 2 lipêmicas e 2 hemolisadas) foi extraída e adicionada de uma solução padrão de concentração conhecida dos analitos e padrão interno para produzir amostras de controle de qualidade fortificadas depois

da extração (FD): controle de qualidade baixo (CQB-FD) e controle de qualidade alto (CQA-FD). Elas foram comparadas com amostras de concentração equivalente preparadas em fase móvel, ou seja, CQB e CQA em solução. Para cada amostra FD foi calculado o fator de matriz normalizado (FMN) e o ensaio foi aprovado de acordo com os preceitos da legislação da ANVISA (2012). A tabela 25 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 25 - Plasma - FMN, média e CV

<b>Controle de qualidade</b>	<b>Matriz</b>	<b>FMN</b>	<b>Média</b>	<b>CV (%)</b>
CQB sofosbuvir (1,50 ng/mL)	Lipêmica 1	1,06	1,06	6,40
	Lipêmica 2	1,11		
	Hemolisada 1	1,09		
	Hemolisada 2	0,98		
	Normal 1	1,19		
	Normal 2	1,00		
	Normal 3	1,05		
	Normal 4	1,02		
CQA sofosbuvir (1600 ng/mL)	Lipêmica 1	1,12	1,05	5,90
	Lipêmica 2	1,07		
	Hemolisada 1	1,05		
	Hemolisada 2	1,06		
	Normal 1	0,91		
	Normal 2	1,06		
	Normal 3	1,06		
	Normal 4	1,11		
CQB GS-331007 (5,00 ng/mL)	Lipêmica 1	1,07	1,04	2,88
	Lipêmica 2	1,05		
	Hemolisada 1	1,03		
	Hemolisada 2	0,98		
	Normal 1	1,05		
	Normal 2	1,08		
	Normal 3	1,04		
	Normal 4	1,04		
CQA GS-331007 (1600 ng/mL)	Lipêmica 1	1,10	1,05	3,17
	Lipêmica 2	1,06		
	Hemolisada 1	1,02		
	Hemolisada 2	1,07		
	Normal 1	1,00		
	Normal 2	1,07		
	Normal 3	1,01		
	Normal 4	1,06		

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.2.1.1 Efeito matriz em plasma com potenciais interferentes

A adição dos potenciais interferentes nicotina e cafeína nas amostras fortificadas pós-extração não aumentou a variação das respostas, resultando em homogeneidade dos valores de FMN e, conseqüentemente, em coeficientes de variação dentro dos limites definidos pela legislação. Portanto, o ensaio foi considerado aprovado. A tabela 26 apresenta os resultados obtidos no ensaio.

Tabela 26 - Plasma com interferentes - FMN, média e CV

<b>Controle de qualidade</b>	<b>Matriz</b>	<b>FMN</b>	<b>Média</b>	<b>CV (%)</b>
CQB sofosbuvir (1,50 ng/mL)	Lipêmica 1	1,35	1,29	12,70
	Lipêmica 2	1,12		
	Hemolisada 1	1,32		
	Hemolisada 2	1,26		
	Normal 1	1,24		
	Normal 2	1,18		
	Normal 3	1,19		
	Normal 4	1,65		
CQA sofosbuvir (1600 ng/mL)	Lipêmica 1	1,16	1,11	3,10
	Lipêmica 2	1,07		
	Hemolisada 1	1,09		
	Hemolisada 2	1,09		
	Normal 1	1,12		
	Normal 2	1,08		
	Normal 3	1,15		
	Normal 4	1,10		
CQB GS-331007 (5,00 ng/mL)	Lipêmica 1	1,21	1,11	6,39
	Lipêmica 2	1,00		
	Hemolisada 1	1,07		
	Hemolisada 2	1,14		
	Normal 1	1,07		
	Normal 2	1,11		
	Normal 3	1,09		
	Normal 4	1,21		
CQA GS-331007 (1600 ng/mL)	Lipêmica 1	1,09	1,06	3,25
	Lipêmica 2	0,99		
	Hemolisada 1	1,06		
	Hemolisada 2	1,08		
	Normal 1	1,04		
	Normal 2	1,04		
	Normal 3	1,10		
	Normal 4	1,08		

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.2.2 Efeito matriz em líquido

O ensaio foi realizado de maneira similar ao executado com a matriz plasma. No entanto, em vez de empregar a matriz branca de 8 indivíduos, foi empregada a matriz branca de 6 indivíduos diferentes, conforme preconizado pela legislação para os casos de validação em matriz biológica diferente de plasma (ANVISA, 2012). Para cada amostra FD foi calculado o fator de matriz normalizado (FMN) e o ensaio foi aprovado de acordo com os preceitos da legislação da ANVISA (2012). Os resultados obtidos são apresentados na tabela 27 a seguir.

Tabela 27 - Líquor - FMN, média e CV

<b>Controle de qualidade</b>	<b>Matriz</b>	<b>FMN</b>	<b>Média</b>	<b>CV (%)</b>
CQB sofosbuvir (1,50 ng/mL)	Matriz 1	0,97	1,00	2,33
	Matriz 2	1,03		
	Matriz 3	1,00		
	Matriz 4	1,00		
	Matriz 5	1,01		
	Matriz 6	0,98		
CQA sofosbuvir (80 ng/mL)	Matriz 1	0,99	0,98	3,79
	Matriz 2	1,02		
	Matriz 3	0,91		
	Matriz 4	0,98		
	Matriz 5	0,97		
	Matriz 6	0,99		
CQB GS-331007 (10 ng/mL)	Matriz 1	0,77	0,77	7,05
	Matriz 2	0,88		
	Matriz 3	0,71		
	Matriz 4	0,77		
	Matriz 5	0,75		
	Matriz 6	0,77		
CQA GS-331007 (150 ng/mL)	Matriz 1	0,80	0,78	6,20
	Matriz 2	0,82		
	Matriz 3	0,70		
	Matriz 4	0,82		
	Matriz 5	0,74		
	Matriz 6	0,81		

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.2.2.1 Efeito matriz em líquido com potenciais interferentes

A adição dos potenciais interferentes nicotina e cafeína nas amostras fortificadas pós-extração não aumentou a variação das respostas e, conseqüentemente, o ensaio foi considerado aprovado. A tabela 28 a seguir apresenta os resultados obtidos.

Tabela 28 - Líquor com interferentes - FMN, média e CV

Controle de qualidade	Matriz	FMN	Média	CV (%)
CQB sofosbuvir (1,50 ng/mL)	Matriz 1	0,90	0,98	4,73
	Matriz 2	0,94		
	Matriz 3	1,02		
	Matriz 4	0,99		
	Matriz 5	0,99		
	Matriz 6	1,01		
CQA sofosbuvir (80 ng/mL)	Matriz 1	0,98	1,00	3,84
	Matriz 2	1,03		
	Matriz 3	0,94		
	Matriz 4	1,03		
	Matriz 5	1,03		
	Matriz 6	0,97		
CQB GS-331007 (10 ng/mL)	Matriz 1	0,77	0,73	13,91
	Matriz 2	0,72		
	Matriz 3	0,71		
	Matriz 4	0,54		
	Matriz 5	0,82		
	Matriz 6	0,81		
CQA GS-331007 (150 ng/mL)	Matriz 1	0,76	0,77	3,17
	Matriz 2	0,81		
	Matriz 3	0,74		
	Matriz 4	0,79		
	Matriz 5	0,76		
	Matriz 6	0,77		

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.2.3 *Efeito matriz em fluido seminal*

O ensaio foi realizado de maneira similar ao descrito para o líquido, que está descrito na seção 4.2.2.2. Para cada amostra FD foi calculado o fator de matriz

normalizado (FMN) e o ensaio foi aprovado de acordo com a legislação. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 29 a seguir.

Tabela 29 - Fluido seminal - FMN, média e CV

<b>Controle de qualidade</b>	<b>Matriz</b>	<b>FMN</b>	<b>Média</b>	<b>CV (%)</b>
CQB sofosbuvir (1,50 ng/mL)	Matriz 1	1,01	0,94	5,00
	Matriz 2	0,94		
	Matriz 3	0,89		
	Matriz 4	0,89		
	Matriz 5	0,95		
	Matriz 6	0,97		
CQA sofosbuvir (80 ng/mL)	Matriz 1	1,00	0,92	6,13
	Matriz 2	0,88		
	Matriz 3	0,94		
	Matriz 4	0,84		
	Matriz 5	0,96		
	Matriz 6	0,91		
CQB GS-331007 (25 ng/mL)	Matriz 1	0,70	0,78	8,14
	Matriz 2	0,78		
	Matriz 3	0,87		
	Matriz 4	0,74		
	Matriz 5	0,82		
	Matriz 6	0,73		
CQA GS-331007 (1200 ng/mL)	Matriz 1	0,69	0,74	6,81
	Matriz 2	0,73		
	Matriz 3	0,82		
	Matriz 4	0,74		
	Matriz 5	0,76		
	Matriz 6	0,68		

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.2.3.1 Efeito matriz em fluido seminal com potenciais interferentes

A inclusão dos potenciais interferentes do estudo (nicotina e cafeína) nas amostras fortificadas pós-extração não aumentou a variação das respostas e, conseqüentemente, o ensaio foi considerado aprovado. A tabela 30 a seguir apresenta os resultados obtidos.

Tabela 30 - Fluido seminal com interferentes - FMN, média e CV

Controle de qualidade	Matriz	FMN	Média	CV (%)
CQB sofosbuvir (1,50 ng/mL)	Matriz 1	1,05	0,99	4,80
	Matriz 2	1,04		
	Matriz 3	0,93		
	Matriz 4	0,96		
	Matriz 5	0,99		
	Matriz 6	0,97		
CQA sofosbuvir (80 ng/mL)	Matriz 1	1,07	0,98	5,47
	Matriz 2	0,95		
	Matriz 3	1,01		
	Matriz 4	0,94		
	Matriz 5	0,98		
	Matriz 6	0,92		
CQB GS-331007 (25 ng/mL)	Matriz 1	0,76	0,79	7,60
	Matriz 2	0,79		
	Matriz 3	0,84		
	Matriz 4	0,79		
	Matriz 5	0,88		
	Matriz 6	0,71		
CQA GS-331007 (1200 ng/mL)	Matriz 1	0,78	0,78	6,82
	Matriz 2	0,80		
	Matriz 3	0,85		
	Matriz 4	0,79		
	Matriz 5	0,69		
	Matriz 6	0,78		

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.3 Contaminação cruzada ou arraste

As amostras de branco (brancos 2 e 3) das matrizes biológicas em estudo permaneceram isentas do efeito de arraste quando injetadas logo após a maior concentração da curva de calibração (LSQ). Dessa forma, foi cumprido o critério de que o percentual de arraste (área do branco/área do LIQ) tem que ser inferior a 20 % da área do analito e inferior a 5 % da área do padrão interno.

Portanto, não houve contaminação cruzada entre as injeções, isto é, não houve adsorção dos analitos e/ou padrões internos nos componentes do injetor nem nas conexões cromatográficas. Dessa maneira, pode-se concluir que os métodos cromatográficos estabelecidos durante o desenvolvimento das metodologias (seção 4.1.5) foram eficazes na eliminação desse evento indesejável, que pode comprometer

a confiabilidade dos resultados. Os resultados obtidos encontram-se compilados tabela 31 a seguir.

Tabela 31 - Área dos brancos, LIQ e LSQ e % de arraste

Matriz	Amostra	Área SFB	Área GS-331007	Área PI	% Arraste		
					SFB	GS-331007	PI
PLASMA	Branco 1	0,00	0,00	0,00	0	0	0
	LIQ	1514,46	2821,81	3885004,91	-	-	-
	LSQ	5642554,20	3086479,18	4239813,41	-	-	-
	Branco 2	0,00	0,00	0,00	0	0	0
	Branco 3	0,00	0,00	0,00	0	0	0
LCR	Branco 1	0	0	0	0	0	0
	LIQ	9999,22	5018,29	1367520,28	-	-	-
	LSQ	2072384,53	335472,26	1354507,81	-	-	-
	Branco 2	0	0	0	0	0	0
	Branco 3	0	0	0	0	0	0
FS	Branco 1	0,00	0,00	0,00	0	0	0
	LIQ	11002,50	6195,64	1060827,40	-	-	-
	LSQ	1540321,36	976880,04	966256,46	-	-	-
	Branco 2	0,00	0,00	0,00	0	0	0
	Branco 3	0,00	0,00	0,00	0	0	0

Legenda:

Plasma (ng/mL): sofosbuvir: LIQ = 0,50 e LSQ = 2000; GS-331007: LIQ = 2 e LSQ = 2000.

Líquor (ng/mL): sofosbuvir: LIQ = 0,50 e LSQ = 100; GS-331007: LIQ = 5 e LSQ = 200.

Fluido seminal (ng/mL): sofosbuvir: LIQ = 0,50 e LSQ = 100; GS-331007: LIQ = 10 e LSQ = 1500.

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.4 Linearidade

Foram avaliadas 3 curvas de calibração para cada matriz biológica em estudo. Elas foram construídas por meio da fortificação da matriz biológica branca com soluções SQR's dos analitos de concentrações conhecidas. Os níveis de concentração estabelecidos para cada ponto da curva encontram-se pormenorizados na seção 4.1.9.

Após a fortificação, as amostras preparadas foram extraídas e injetadas no sistema LC-MS/MS. Todas as curvas analíticas foram ajustadas por regressão linear por mínimos quadrados com fator de ponderação de  $1/x^2$ . Elas apresentaram coeficiente de correlação ( $r$ ) maior ou igual a 0,99, sendo, portanto, aprovadas. Em consequência, pode-se concluir que as faixas de concentração das curvas de calibração estabelecidas no desenvolvimento das metodologias (seção 4.1.9) foram lineares nas matrizes estudadas e apresentaram-se adequadas para quantificação das amostras clínicas do ensaio piloto, assegurando a proporcionalidade entre a concentração e a resposta analítica bem como determinações quantitativas confiáveis. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 32.

Tabela 32 - Sofosbuvir e GS-331007 em plasma, LCR e FS - curvas de calibração bioanalíticas

Matriz	Dia	SFB		GS-331007	
		Curva	r	Curva	r
PLASMA	1	$y = 0,343x - 1,64E-06$	0,9976	$y = 0,189x + 1,14E-06$	0,9980
	2	$y = 0,341x + 1,07E-05$	0,9984	$y = 0,219x + 1,16E-05$	0,9976
	3	$y = 0,379x + 1,10E-05$	0,9968	$y = 0,201x + 5,44E-05$	0,9979
LCR	1	$y = 7,07x + 8,74E-05$	0,9986	$y = 0,564x - 6,70E-04$	0,9951
	2	$y = 7,19x + 3,39E-06$	0,9989	$y = 0,579x + 9,03E-05$	0,9984
	3	$y = 6,79x + 2,44E-04$	0,9990	$y = 0,585x + 9,48E-05$	0,9971
FS	1	$y = 0,683x + 2,58E-03$	0,9993	$y = 0,0200x + 2,52E-05$	0,9985
	2	$y = 0,752x + 3,14E-03$	0,9995	$y = 0,0217x + 3,15E-04$	0,9989
	3	$y = 0,797x + 3,98E-03$	0,9990	$y = 0,0246x + 2,98E-04$	0,9985

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.5 Precisão, exatidão e processo de diluição

A precisão, exatidão e eficiência do processo de diluição foram examinados por meio de ensaios intracorrída (intradia) e intercorrída (interdia). Para a avaliação intercorrída, 3 analistas executaram o ensaio em 3 dias consecutivos.

Para a matriz plasma, em cada dia de ensaio foram analisadas 8 replicatas das seguintes amostras de controle de qualidade: CQB, CQM, CQA e CQD. Por outro lado, devido à quantidade limitada da matriz branca de líquido e fluido seminal, foram analisadas apenas 5 replicatas de cada nível de controle de qualidade.

No que se refere ao processo de diluição, o fator de diluição de 4 vezes foi aplicado à metodologia de quantificação em plasma, enquanto em líquido e fluido seminal o fator adotado foi igual a 5.

As tabelas a seguir apresentam os resultados obtidos para as metodologias de quantificação de sofosbuvir e GS-331007 em plasma (tabelas 33 e 34), líquido (tabelas 35 e 36) e fluido seminal (tabelas 37 e 38). Eles confirmam que as metodologias são precisas e exatas em todos os níveis de concentração testados. Além disso, o processo de diluição validado mostrou-se adequado, pois as replicatas de CQD apresentaram coeficiente de variação menor ou igual a 15 % e a exatidão entre 85 e 115 %.

Diante dos resultados obtidos, é possível afirmar que as quantificações de sofosbuvir e GS-331007 nas matrizes estudadas apresentaram alto grau de concordância e exatidão em diferentes níveis de concentração. Além disso, em condições de rotina laboratorial, inclusive variando analistas e instrumentos como pipetas e agitadores de tubos/microtubos, não houve prejuízo na performance analítica. Cabe ainda destacar que o protocolo de extração desenvolvido e as substâncias empregadas como padrão interno (cimetidina para o plasma, zidovudina para o líquido e diazepam para o fluido seminal) mostraram-se capazes de corrigir as flutuações intrínsecas das metodologias bioanalíticas. Quanto ao processo de diluição estabelecido no desenvolvimento das metodologias, é pertinente concluir que as amostras clínicas com concentração superior ao LSQ foram devidamente diluídas e reanalisadas, não ocorrendo efeitos negativos na qualidade dos resultados gerados.

Tabela 33 - Sofosbuvir em plasma - Controles: média, CV e exatidão

Dia	Parâmetro	Controle de qualidade em plasma (ng/mL)			
		CQB (1,50)	CQM (800)	CQA (1600)	CQD (6400)
1 (n=8)	Média (ng/mL)	1,36	743,15	1626,71	1708,98
	CV (%)	10,42	1,40	3,38	2,55
	Exatidão (%)	90,79	92,89	101,67	106,81
2 (n=8)	Média (ng/mL)	1,42	848,10	1821,34	1766,87
	CV (%)	5,30	2,61	4,58	1,66
	Exatidão (%)	94,84	106,01	113,83	110,43
3 (n=8)	Média (ng/mL)	1,47	833,42	1790,78	1721,97
	CV (%)	6,60	3,60	3,26	3,61
	Exatidão (%)	98,30	104,18	111,92	107,62
Interdia (n=24)	Média (ng/mL)	1,42	808,22	1746,28	1732,61
	CV (%)	8,02	6,43	6,19	2,98
	Exatidão (%)	94,64	101,03	109,14	108,29

Fonte: (Do autor, 2022)

Tabela 34 - GS-331007 em plasma - Controles: média, CV e exatidão

Dia	Parâmetro	Controle de qualidade em plasma (ng/mL)			
		CQB (5,00)	CQM (800)	CQA (1600)	CQD (6400)
1 (n=8)	Média (ng/mL)	4,67	746,81	1590,26	1660,25
	CV (%)	4,94	2,19	2,07	2,81
	Exatidão (%)	93,30	93,35	99,39	103,77
2 (n=8)	Média (ng/mL)	4,66	790,71	1701,04	1628,01
	CV (%)	3,33	3,24	4,18	2,09
	Exatidão (%)	93,10	98,84	106,31	101,75
3 (n=8)	Média (ng/mL)	4,71	840,85	1774,42	1711,82
	CV (%)	4,01	3,08	2,41	3,62
	Exatidão (%)	94,23	105,11	110,90	106,99
Interdia (n=24)	Média (ng/mL)	4,68	792,79	1688,57	1666,70
	CV (%)	4,00	5,68	5,43	3,51
	Exatidão (%)	93,54	99,10	105,54	104,17

Fonte: (Do autor, 2022).

Tabela 35 - Sofosbuvir em líquido - Controles: média, CV e exatidão

Dia	Parâmetro	Controle de qualidade em líquido (ng/mL)			
		CQB (1,50)	CQM (40)	CQA (80)	CQD (200)
1 (n=5)	Média (ng/mL)	1,41	41,70	82,30	84,79
	CV (%)	7,66	3,48	2,44	1,46
	Exatidão (%)	94,27	104,26	102,87	105,98
2 (n=5)	Média (ng/mL)	1,43	39,45	78,12	76,99
	CV (%)	3,79	4,97	2,13	4,58
	Exatidão (%)	95,27	98,63	97,65	96,24
3 (n=5)	Média (ng/mL)	1,44	40,91	78,62	78,77
	CV (%)	4,39	5,16	2,22	4,71
	Exatidão (%)	95,71	102,27	98,27	98,47
Interdia (n=15)	Média (ng/mL)	1,43	40,69	79,68	80,18
	CV (%)	5,16	4,86	3,20	5,56
	Exatidão (%)	95,08	101,72	99,60	100,23

Fonte: (Do autor, 2022).

Tabela 36 - GS-3310007 em líquido - Controles: média, CV e exatidão

Dia	Parâmetro	Controle de qualidade em líquido (ng/mL)			
		CQB (10)	CQM (75)	CQA (150)	CQD (750)
1 (n=5)	Média (ng/mL)	9,79	70,13	145,34	142,10
	CV (%)	6,01	8,30	11,31	9,52
	Exatidão (%)	97,90	93,51	96,89	94,73
2 (n=5)	Média (ng/mL)	9,83	73,73	157,58	149,89
	CV (%)	8,31	5,01	3,11	2,98
	Exatidão (%)	98,32	98,31	105,06	99,93
3 (n=5)	Média (ng/mL)	9,61	73,50	153,23	149,18
	CV (%)	6,65	3,18	4,81	5,64
	Exatidão (%)	96,08	98,01	102,15	99,45
Interdia (n=15)	Média (ng/mL)	9,74	72,46	152,05	147,06
	CV (%)	6,62	5,86	7,41	6,50
	Exatidão (%)	97,43	96,61	101,37	98,04

Fonte: (Do autor, 2022)

Tabela 37 - Sofosbuvir em fluido seminal - Controles: média, CV e exatidão

Dia	Parâmetro	Controle de qualidade em fluido seminal (ng/mL)			
		CQB (1,50)	CQM (40)	CQA (80)	CQD (200)
1 (n=5)	Média (ng/mL)	1,58	41,16	91,01	84,60
	CV (%)	4,82	9,41	4,61	1,39
	Exatidão (%)	105,55	102,89	113,76	105,75
2 (n=5)	Média (ng/mL)	1,53	39,55	82,47	77,32
	CV (%)	7,02	2,26	2,97	2,06
	Exatidão (%)	101,88	98,88	103,09	96,65
3 (n=5)	Média (ng/mL)	1,44	39,53	81,64	81,70
	CV (%)	4,93	1,84	4,60	1,65
	Exatidão (%)	95,88	98,84	102,06	102,12
Interdia (n=15)	Média (ng/mL)	1,52	40,08	85,04	81,20
	CV (%)	6,66	5,74	6,44	4,13
	Exatidão (%)	101,10	100,20	106,30	101,51

Fonte: (Do autor, 2022).

Tabela 38 - GS-331007 em fluido seminal - Controles: média, CV e exatidão

Dia	Parâmetro	Controle de qualidade em fluido seminal (ng/mL)			
		CQB (25)	CQM (600)	CQA (1200)	CQD(6000)
1 (n=5)	Média (ng/mL)	28,11	603,09	1266,29	1224,61
	CV (%)	14,76	13,91	4,69	2,41
	Exatidão (%)	112,43	100,51	105,52	102,05
2 (n=5)	Média (ng/mL)	24,24	617,29	1264,13	1272,86
	CV (%)	8,16	2,15	1,45	3,86
	Exatidão (%)	96,95	102,88	105,34	106,07
3 (n=5)	Média (ng/mL)	24,44	603,44	1214,45	1273,07
	CV (%)	9,74	2,38	5,42	3,66
	Exatidão (%)	97,76	100,57	101,20	106,09
Interdia (n=15)	Média (ng/mL)	25,60	607,94	1248,29	1256,85
	CV (%)	12,98	7,66	4,36	3,66
	Exatidão (%)	102,38	101,32	104,02	104,74

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.6 Estabilidade dos analitos em matriz biológica

Os estudos de estabilidade foram realizados de forma a contemplar as condições que as amostras clínicas dos participantes do ensaio (amostras de concentração desconhecida) foram submetidas. Para tal, foram realizados os seguintes ensaios de estabilidade:

- curta duração: temperatura laboratorial (22 °C por 4 h);
- pós-extração (pós-processamento): no autoinjeter (10 °C por 22 h);
- após ciclos de congelamento e degelo (CD): 6 ciclos;
- longa duração (sob condições de armazenamento): *freezer* -70 °C por 120 dias.

Para determinação da estabilidade em plasma, foram analisadas 8 replicatas do controle de qualidade baixo (CQB) e alto (CQA), enquanto para o líquor e fluido seminal, apenas 5 replicatas de cada nível foram avaliadas devido à menor disponibilidade de matriz branca. Salienta-se que, considerando a alta complexidade das matrizes deste estudo e que não é permitido fazer extrapolações sobre os dados de estabilidade, todos ensaios preconizados pela legislação foram realizados com o plasma, líquor e fluido seminal (ANVISA, 2012; KADIAN et al., 2016). Os resultados evidenciaram ausência de degradação dos analitos nas condições investigadas, uma vez que o desvio em relação à concentração nominal foi de até 15 %, que é o critério definido na legislação vigente.

Por conseguinte, os dados obtidos comprovam a ausência de degradação dos analitos sofobuvir e GS-331007 nas amostras clínicas nas condições a que foram submetidas desde a coleta até a análise. Tais condições abrangem a avaliação dos seguintes elementos: presença de ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) no plasma; tempo que a amostra permanece na bancada do laboratório; influências das múltiplas etapas de extração (aliquotagem, agitação, centrifugação, evaporação, congelamento e ressuspensão); tempo que a amostra extraída permanece no equipamento até o momento da injeção; impacto do congelamento e descongelamento das amostras e, por fim, o período em que permanecem congeladas em *freezer* -70 °C aguardando o dia da análise. Portanto, uma vez assegurada a

estabilidade das amostras, foi possível certificar a confiabilidade dos resultados obtidos após a análise das amostras clínicas e a adequação de todas as etapas compreendidas nas metodologias desenvolvidas. Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas 39 e 40 a seguir.

Tabela 39 - Sofosbuvir em plasma, líquido e fluido seminal - estabilidades

Desvio em relação à concentração nominal (%)					
Matriz	Controle de qualidade (ng/mL)	Curta (22 °C, 4 h)	Pós-extração (10 °C, 22 h)	Ciclos CD (6 ciclos)	Longa (-70 °C, 120 dias)
PLASMA (n=8)	CQB (1,50)	-0,05	-9,67	-10,06	+9,03
	CQA (1600)	+7,15	+6,70	+10,52	-1,55
LCR (n=5)	CQB (1,50)	-1,37	-4,66	-8,45	-1,22
	CQA (80)	+2,42	-1,31	-4,18	+4,71
FS (n=5)	CQB (1,50)	+5,55	+4,88	+3,00	-1,05
	CQA (80)	-2,83	-0,98	-9,18	+0,69

Fonte: (Do autor, 2022).

Tabela 40 - GS-331007 em plasma, líquido e fluido seminal - estabilidades

Desvio em relação à concentração nominal (%)					
Matriz	Controle de qualidade (ng/mL)	Curta (22 °C, 4 h)	Pós-extração (10 °C, 22 h)	Ciclos CD (6 ciclos)	Longa (-70 °C, 120 dias)
PLASMA (n=8)	CQB (5,00)	-0,54	+1,79	-4,12	+1,90
	CQA (1600)	+7,76	+6,64	+3,77	+0,04
LCR (n=5)	CQB (10)	+5,58	+4,84	-10,56	-5,44
	CQA (150)	+4,37	+2,11	-2,41	+6,80
FS (n=5)	CQB (25)	+10,31	-8,65	+3,91	+4,27
	CQA (1200)	-5,55	-0,98	-7,29	+5,88

Fonte: (Do autor, 2022).

#### 4.2.7 Estabilidade dos analitos e padrões internos nas soluções SQR

A estabilidade dos analitos (sofosbuvir e GS-331007) e padrões internos (cimetidina, zidovudina e diazepam) nas soluções SQR's utilizadas para a confecção dos pontos da curva de calibração, controles de qualidade e soluções de trabalho dos padrões internos foi avaliada conforme condições dos seguintes ensaios:

- curta duração: temperatura de 22 °C por 24 h;
- sob condições de armazenamento: *freezer* -70 °C por 7 dias.

A avaliação consistiu na análise de 8 amostras de cada nível de concentração testado. Para os analitos, o exame ocorreu com base na solução de maior concentração (solução estoque) e na solução de menor concentração (solução utilizada para confecção do LIQ). Concomitantemente, a estabilidade dos padrões internos (PI) foi avaliada por meio das soluções estoque e das soluções de trabalho (solução de uso).

A fim de evitar problemas como saturação do sistema, picos divididos e alteração nos tempos de retenção, as soluções em exame, preparadas em metanol:água nas proporções 80:20 (v/v) e 50:50 (v/v), foram diluídas em fase móvel antes da injeção no equipamento. As áreas dos picos cromatográficos das soluções em teste, isto é, que foram submetidas às condições de estabilidade, foram confrontadas com as áreas das soluções recém-preparadas.

As soluções foram consideradas estáveis, pois atenderam aos requisitos da legislação: desvio máximo de 10 % em relação às recém-preparadas. Em outras palavras, a média das respostas analíticas das soluções testadas foram próximas da média das respostas analíticas das soluções recém-preparadas (isentas de qualquer efeito de degradação), comprovando que as soluções SRQ utilizadas no desenvolvimento e validação foram estáveis dentro do período de uso. Em conclusão, pode-se afirmar que as soluções de metanol:água na proporção 80:20 (v/v) e metanol:água 50:50 (v/v), que foram determinadas durante o desenvolvimento das metodologias bioanalíticas (seções 4.1.1 e 4.1.2), foram adequadas e permitiram a preservação dos analitos e padrões internos nas condições investigadas (22 °C por 24 h e -70 °C por 7 dias).

As tabelas a seguir apresentam os resultados obtidos para as soluções utilizadas nas metodologias de quantificação de sofosbuvir e GS-331007 em plasma (tabelas 41 e 42), líquido (tabelas 43 e 44) e fluido seminal (tabelas 45 e 46).

Tabela 41 - Sofosbuvir, GS-331007 e PI - estabilidade curta duração

Metodologia	Substância	Solução	Área média		Desvio (%)
			Recém-preparada	Teste (22 °C, 24 h)	
PLASMA (n=8)	Sofosbuvir	LIQ	2020,08	2068,17	+2,38
		Estoque	7303460,34	7175547,66	-1,75
	GS-331007	LIQ	8116,90	8047,75	-0,85
		Estoque	6813547,32	6732154,47	-1,19
	Cimetidina (PI)	Trabalho	1953224,98	1961349,46	+0,42
		Estoque	15514469,79	15292860,37	-1,43

Fonte: (Do autor, 2022).

Tabela 42 - Sofosbuvir, GS-331007 e PI - estabilidade armazenamento

Metodologia	Substância	Solução	Área média		Desvio (%)
			Recém-preparada	Teste (-70 °C, 7 dias)	
PLASMA (n=8)	Sofosbuvir	LIQ	6496,92	6373,95	-1,89
		Estoque	7802261,70	7651900,61	-1,93
	GS-331007	LIQ	17868,43	18259,63	+2,19
		Estoque	6103064,16	6065922,70	-0,61
	Cimetidina (PI)	Trabalho	1796198,46	1807358,66	+0,62
		Estoque	14946213,44	14886541,47	-0,40

Fonte: (Do autor, 2022).

Tabela 43 - Sofosbuvir, GS-331007 e PI - estabilidade curta duração

Metodologia	Substância	Solução	Área média		Desvio (%)
			Recém-preparada	Teste (22 °C, 24 h)	
LCR (n=8)	Sofosbuvir	LIQ	9462,50	9384,24	-0,83
		Estoque	1906472,18	1901391,64	-0,27
	GS-331007	LIQ	13533,78	13872,41	+2,50
		Estoque	474201,04	480768,19	+1,38
	Zidovudina (PI)	Trabalho	2109524,36	2112891,62	+0,16
		Estoque	17136457,84	17266899,40	+0,76

Fonte: (Do autor, 2022).

Tabela 44 - Sofosbuvir, GS-331007 e PI - estabilidade armazenamento

Metodologia	Substância	Solução	Área média		Desvio (%)
			Recém-preparada	Teste (-70 °C, 7 dias)	
LCR (n=8)	Sofosbuvir	LIQ	11702,99	11975,28	+2,33
		Estoque	1838341,77	1847337,28	+0,49
	GS-331007	LIQ	18413,29	18565,20	+0,83
		Estoque	578474,39	576559,01	-0,33
	Zidovudina (PI)	Trabalho	2062980,76	2076685,15	+0,66
		Estoque	17897618,10	17925244,32	+0,15

Fonte: (Do autor, 2022).

Tabela 45 - Sofosbuvir, GS-331007 e PI - estabilidade curta duração

Metodologia	Substância	Solução	Área média		Desvio (%)
			Recém-preparada	Teste (22 °C, 24 h)	
FS (n=8)	Sofosbuvir	LIQ	7185,81	7442,78	+3,58
		Estoque	1123507,13	1132438,62	+0,79
	GS-331007	LIQ	9065,22	9129,80	+0,71
		Estoque	1065602,91	1110800,29	+4,24
	Diazepam (PI)	Trabalho	834411,54	837977,43	+0,43
		Estoque	8571560,30	8414767,81	-1,83

Fonte: (Do autor, 2022).

Tabela 46 - Sofosbuvir, GS-331007 e PI - estabilidade armazenamento

Metodologia	Substância	Solução	Área média		Desvio (%)
			Recém-preparada	Teste (-70 °C, 7 dias)	
FS (n=8)	Sofosbuvir	LIQ	5062,72	4918,24	-2,85
		Estoque	926930,95	912556,82	-1,55
	GS-331007	LIQ	8511,82	8376,57	-1,59
		Estoque	997830,29	987608,82	-1,02
	Diazepam (PI)	Trabalho	1298312,74	1289999,97	-0,64
		Estoque	12193163,26	11990149,82	-1,66

Fonte: (Do autor, 2022).

### 4.3 Ensaio clínico piloto e quantificação das amostras

Trata-se do primeiro estudo farmacocinético em humanos a investigar a concentração de sofosbuvir e de seu principal metabólito (GS-331007) em líquido e fluido seminal após a administração, em jejum, de um comprimido contendo 400 mg de sofosbuvir (Sovaldi®) a indivíduos saudáveis. O estudo ocorreu em duas etapas independentes, com intervalo de 2 semanas (*washout*) entre elas, conforme apresentado nas seções 3.5.1 e 3.5.2.

Vale mencionar que o intervalo adotado foi superior a 7 meias-vidas de eliminação do sofosbuvir ( $t_{1/2} = 0,38$  a  $0,54$  h) e do metabólito GS-331007 ( $t_{1/2} = 24,68$  a  $27$  h), assegurando a completa eliminação dos analitos do organismo dos participantes, conforme dados farmacocinéticos da tabela 1. Portanto, levando em consideração que em cada fase os sujeitos da pesquisa tomaram um comprimido de 400 mg de sofosbuvir, não houve efeitos residuais entre elas, o que poderia comprometer os resultados encontrados.

Na primeira etapa, os indivíduos, 8 homens e 4 mulheres, tomaram um comprimido de 400 mg de sofosbuvir (Sovaldi®) e tiveram coletadas amostras de plasma e líquido nos tempos de 1h:30min e 5h:00min após a administração do medicamento. Na segunda etapa, que contemplou apenas a participação dos 8 homens, os indivíduos tomaram um comprimido de 400 mg de sofosbuvir e foram divididos em dois grupos de 4 pessoas: o primeiro para coleta de plasma e fluido seminal no tempo de 1h:30min após a administração e o segundo para a coleta de plasma e fluido seminal 5h:00min após a administração.

Os tempos de coleta já haviam sido pré-determinados pelo centro responsável pela etapa clínica deste estudo, ou seja, Scentryphar Pesquisa Clínica Ltda. Vale apontar que os tempos selecionados visaram identificar os picos de concentração dos analitos e que, dado o caráter pioneiro e experimental desta pesquisa, não foi permitida a inclusão de pontos adicionais. Além disso, tendo em vista que o Protocolo Clínico e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A) previram a quantificação apenas de sofosbuvir e GS-331007, estavam vedadas as análises de outros metabólitos nas amostras recebidas.

As amostras coletadas foram quantificadas em corridas analíticas monitoradas por controles de qualidade e em total acordo com as condições estabelecidas na

validação das metodologias bioanalíticas, assegurando a qualidade e confiabilidade dos resultados. Dessa maneira, apesar da alta variabilidade dos resultados encontrados, o que, aliás, já era esperado considerando tratar-se de um estudo in vivo, foi possível elucidar aspectos concernentes à penetração de sofosbuvir e seu principal metabólito (GS-331007) no sistema nervoso central (SNC) e reprodutivo masculino de pessoas saudáveis após uma dose única de 400 mg de sofosbuvir, proporcionando informações até então desconhecidas sobre esse fármaco que vem apresentando resultados promissores no combate à Zika.

#### 4.3.1 Primeira Etapa - penetração no sistema nervoso central

Doze indivíduos saudáveis, sendo 8 homens e 4 mulheres, foram incluídos nesta etapa do estudo. Amostras concomitantes de sangue em EDTA K3 e líquido foram coletadas nos tempos de 1h:30 min e 5h:00 min após a administração de um comprimido do medicamento de referência contendo 400 mg de sofosbuvir (Sovaldi®). O sangue foi centrifugado para obter o plasma sanguíneo. Detalhes sobre as coletas podem ser consultados na seção 3.5. No total, 48 amostras clínicas foram coletadas, sendo 24 de sangue (12 no tempo de 1h:30 min e 12 no tempo de 5h:00 min) e 24 de líquido (12 no tempo de 1h:30 min e 12 no tempo de 5h:00 min).

Os resultados encontrados são apresentados nas seções 4.3.1.1 e 4.3.1.2 a seguir.

##### 4.3.1.1 Penetração de sofosbuvir no sistema nervoso central

Em plasma, no tempo de 01h:30min, a concentração média foi de  $88,45 \pm 78,12$  ng/mL, variando de 9,43 a 256,55 ng/mL, enquanto em 5h:00min a média foi de  $3,93 \pm 4,54$  ng/mL, variando de  $< 0,50$  a 13,98 ng/mL.

Diferentemente do resultado na matriz plasma, a concentração de sofosbuvir nas amostras de líquido foi menor do que o LIQ estabelecido para a metodologia (0,50 ng/mL), inviabilizando o cálculo da razão LCR/plasma (divisão entre a concentração em líquido e a concentração em plasma sanguíneo), que é um indicativo da penetração da substância no SNC (KULKARNI et al., 2016). A propósito, a abordagem adotada nesta pesquisa também está presente em trabalhos da literatura científica, tais como

em estudos que avaliaram a penetração de substâncias utilizadas na terapia antirretroviral, mais especificamente os fármacos lamivudina, lopinavir, efavirenz, nevirapina, tenofovir, abacavir, emtricitabina, zidovudina e o bictegravir (VAN DEN HOF et al., 2018; RIGO-BONNIN et al., 2020)

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 47 e figura 70 a seguir.

Tabela 47 - Sofosbuvir em plasma e LCR - concentração e razão de penetração

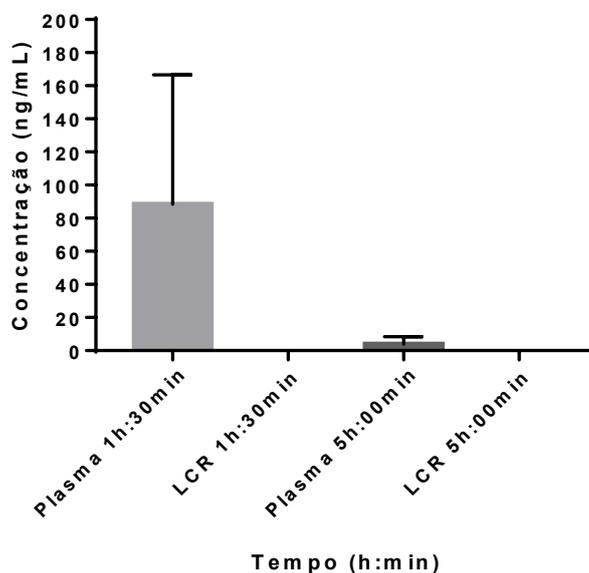
Indivíduo	Sofosbuvir					
	1h:30min			5h:00min		
	Plasma (ng/mL)	LCR (ng/mL)	Razão LCR/plasma (%)	Plasma (ng/mL)	LCR (ng/mL)	Razão LCR/plasma (%)
1	27,58	< LIQ	-	5,12	< LIQ	-
2	92,65	< LIQ	-	0,59	< LIQ	-
3	164,93	< LIQ	-	0,84	< LIQ	-
4	173,39	< LIQ	-	0,57	< LIQ	-
5	256,55	< LIQ	-	< LIQ	< LIQ	-
6	67,43	< LIQ	-	0,71	< LIQ	-
7	22,97	< LIQ	-	5,14	< LIQ	-
8	9,43	< LIQ	-	9,18	< LIQ	-
9	18,02	< LIQ	-	< LIQ	< LIQ	-
10	40,26	< LIQ	-	2,01	< LIQ	-
11	50,71	< LIQ	-	13,98	< LIQ	-
12	137,46	< LIQ	-	1,14	< LIQ	-
<b>Média</b>	88,45	< LIQ	-	3,93	< LIQ	-
<b>Desvio padrão</b>	78,12	-	-	4,54	-	-
<b>Menor</b>	9,43	< LIQ	-	< LIQ	< LIQ	-
<b>Maior</b>	256,55	< LIQ	-	13,98	< LIQ	-

Legenda: LIQ sofosbuvir em plasma = 0,50 ng/mL; LIQ sofosbuvir em Líquor = 0,50 ng/mL

Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 70 - Sofosbuvir em plasma e LCR - concentração

**CONCENTRAÇÃO DE SOFOSBUVIR EM PLASMA E LCR**



Fonte: (Do autor, 2022).

Analisando os resultados em plasma, constata-se que o tempo de coleta de 1h:30min, apesar de estar dentro da faixa esperada para o  $t_{max}$  (0,5 a 2,0 h), não apresentou concentrações de sofosbuvir equivalentes às apresentadas nas publicações consultadas, isto é, 622,0 a 1860,1 ng/mL, que são descritas na tabela 1. Esse achado pode ser atribuído ao fato de que o tempo de 1h:30min não corresponda efetivamente ao pico de concentração plasmática, ou seja, não corresponda ao  $C_{max}$ . Posto isso, em uma investigação futura, seria pertinente incluir ou até mesmo selecionar outros pontos de coleta, tais como 0,5 e 1,0 h. Merece ser destacado que os dados da literatura consultada são oriundos de estudos em condições similares às da presente pesquisa: indivíduos saudáveis que tomaram uma dose única de 400 mg do medicamento de referência (Sovaldi®) em jejum.

Com relação ao observado em líquido, é possível depreender que há uma baixa penetração de sofosbuvir no SNC. Todavia, para uma conclusão mais robusta, um número maior de participantes e pontos de coleta são impositivos em futuras investigações, que, aliás, podem ter como direcionamento os resultados da presente pesquisa.

Vale lembrar que o sofosbuvir é um fármaco da classe III de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), isto é, possui alta solubilidade e

baixa permeabilidade. Consequentemente, sua passagem pelas membranas biológicas sofre grande influência de transportadores como a Glicoproteína-P (P-gp) e a Proteína de Resistência ao Câncer de Mama (BCRP). Tais transportadores estão presentes na membrana intestinal e barreira hematoencefálica (BHE) e atuam limitando a entrada de xenobióticos no organismo e no SNC (KIRBY et al., 2015; GOODMAN et al., 2018).

Embora os resultados obtidos apontem para uma aparente ineficácia do sofosbuvir no combate aos efeitos deletérios da Zika, a inflamação das meninges em indivíduos infectados (meningite) aumenta a permeabilidade da BHE e, consequentemente, favorece uma maior penetração de substâncias no SNC (LEDA et al., 2019). Nesse sentido, cabe destacar que estudos prévios demonstraram a capacidade do fármaco em reduzir os danos ao sistema nervoso de animais, reforçando a hipótese de que o fármaco poderia produzir efeitos positivos em humanos infectados (SOUZA et al., 2017b; MESCI et al., 2018; GARDINALI et al., 2020).

Dessa maneira, posto que o ensaio clínico contemplou apenas pessoas saudáveis, o que é uma limitação desta pesquisa, o resultado obtido pode não refletir o comportamento real do fármaco em indivíduos infectados, conforme pontuado por Decloedt e colaboradores (2015). Além disso, a quantificação da fração livre (não ligada às proteínas plasmáticas) em vez da quantidade total pode conduzir a um desfecho diferente, tal como foi observado em um estudo com o antiviral efavirenz (DECLOEDT et al., 2015). Por fim, merece ser destacado que uma modificação na dose e regime de administração, também poderiam conduzir à resultados diferentes.

#### *4.3.1.2 Penetração de GS-31007 no sistema nervoso central*

A concentração média de GS-331007 em plasma foi de  $575,68 \pm 348,87$  ng/mL (90,28 a 1273,34 ng/mL) em 01h:30min e de  $809,95 \pm 233,65$  ng/mL (411,54 a 1131,99 ng/mL) em 5h:00min.

Em líquido, observou-se uma baixa concentração do metabólito nos pontos avaliados. Em 01h:30min, a concentração média foi de  $8,14 \pm 1,98$  ng/mL (< LIQ a 10,32 ng/mL) e em 5h:00min a média foi  $36,80 \pm 26,83$  ng/mL (10,21 a 93,25 ng/mL).

A razão LCR/plasma pôde ser calculada apenas para 3 amostras do tempo de 1h:30 min, pois as outras 9 amostras apresentaram resultado inferior ao LIQ da metodologia. O resultado obtido (em percentual) foi de  $0,94 \pm 0,24$  (0,79 a 1,22). Para o tempo de 5h:00 min, a razão pôde ser calculada para todas as amostras, sendo os valores (em percentual) de  $4,51 \pm 2,71$  (1,15 a 9,33).

Vale ressaltar que, embora o metabólito GS-331007 não apresente atividade antiviral, ele é o principal metabólito circulante do sofosbuvir, sendo então monitorado nos estudos farmacocinéticos. A forma ativa do sofosbuvir (GS-461203) é encontrada apenas no meio intracelular, não sendo possível sua quantificação em fluidos biológicos (KIRBY et al., 2015). Além disso, diferentemente do sofosbuvir, o metabólito GS-331007 não é substrato das bombas de efluxo P-gp e BCRP presentes na barreira hematoencefálica (KIRBY et al., 2015; DECLOEDT et al., 2015).

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 48 e nas figuras 71 e 72.

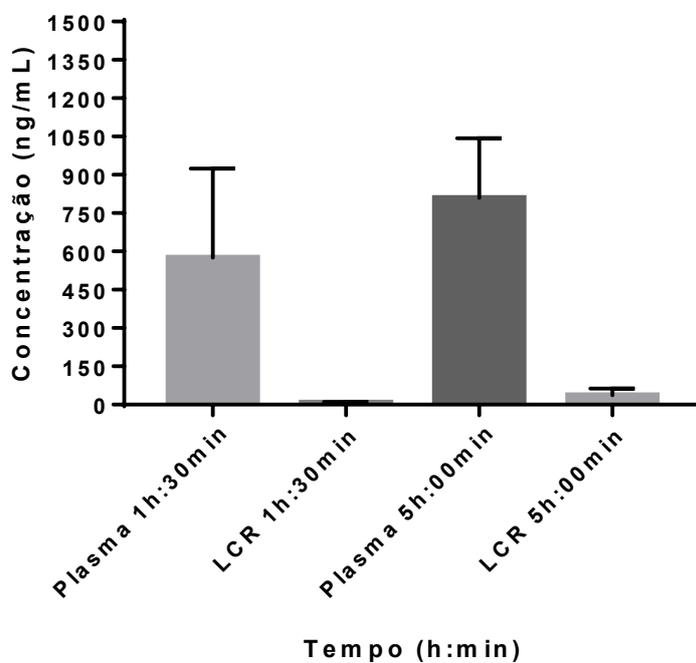
Tabela 48 - GS-331007 em plasma e LCR - concentração e razão de penetração

Indivíduo	GS-331007					
	1h:30min			5h:00min		
	Plasma (ng/mL)	LCR (ng/mL)	Razão LCR/plasma (%)	Plasma (ng/mL)	LCR (ng/mL)	Razão LCR/plasma (%)
1	134,49	< LIQ	-	411,54	24,87	6,04
2	708,86	< LIQ	-	891,66	10,21	1,15
3	638,31	< LIQ	-	631,60	11,26	1,78
4	816,19	6,44	0,79	614,77	14,50	2,36
5	962,79	< LIQ	-	656,29	32,47	4,95
6	385,07	< LIQ	-	626,67	21,10	3,37
7	629,24	7,66	1,22	955,95	32,79	3,43
8	90,28	< LIQ	-	1098,00	15,78	1,44
9	1273,34	10,32	0,81	712,54	66,50	9,33
10	565,83	< LIQ	-	887,80	52,20	5,88
11	188,99	< LIQ	-	1100,61	93,25	8,47
12	514,80	< LIQ	-	1131,99	66,65	5,89
<b>Média</b>	575,68	8,14	0,94	809,95	36,80	4,51
<b>Desvio padrão</b>	348,87	1,98	0,24	233,65	26,83	2,71
<b>Menor</b>	90,28	< LIQ	0,79	411,54	10,21	1,15
<b>Maior</b>	1273,34	10,32	1,22	1131,99	93,25	9,33

Legenda: LIQ GS-331007 em plasma = 2,00 ng/mL; LIQ GS-331007 em líquido = 5,00 ng/mL

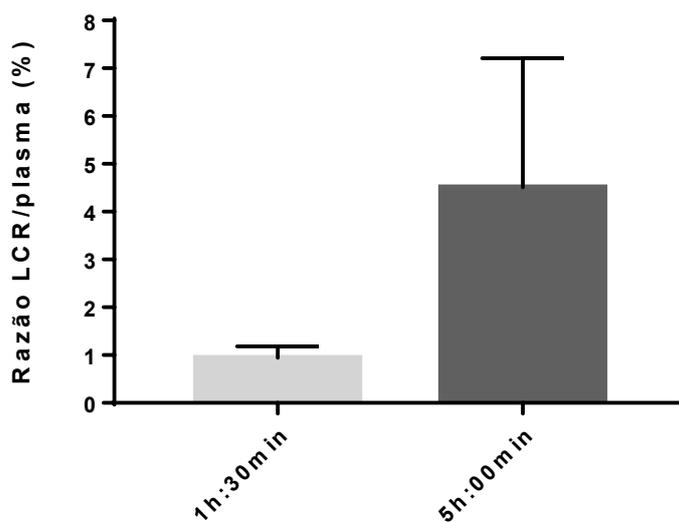
Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 71 - GS-331007 em plasma e LCR - concentração

**CONCENTRAÇÃO DE GS-331007 EM PLASMA E LCR**

Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 72 - GS-331007 - razão de penetração no SNC

**PENETRAÇÃO DE GS-331007 NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Fonte: (Do autor, 2022).

Estabelecendo uma comparação entre os resultados do presente estudo com outros trabalhos (tabela 1), é possível afirmar que o tempo de coleta de 5h:00min, que supostamente corresponderia ao pico de concentração plasmática do metabólito GS-331007, não exibiu concentrações compatíveis com as já descritas (picos de concentração plasmática de 1096,9 a 1455,5 ng/mL ocorrendo entre 1,5 e 4 h). Esse achado, conforme destacado na seção 4.3.1.1, pode estar relacionado à escolha dos tempos de coleta deste estudo.

Em face ao exposto, apesar do pequeno número de participantes, os resultados sugerem uma baixa penetração de GS-331007 no SNC. Entretanto, conforme explicitado em 4.3.1.1, o presente estudo poderá auxiliar na inclusão ou seleção de novos pontos de coleta, contribuindo para ampliar o entendimento sobre o assunto.

Ademais, a partir das análises realizadas, não é possível inferir sobre a origem do GS-331007 encontrado no SNC. Em primeiro lugar, ele pode ter cruzado a barreira hematoencefálica (BHE) a partir da corrente sanguínea. Em segundo lugar, pode ter sido gerado no SNC pelas reações de biotransformação. Por fim, ambos os mecanismos citados podem ter contribuído para a presença de GS-331007 no SNC.

#### 4.3.2 Segunda etapa - penetração no sistema reprodutivo masculino

Duas semanas após a primeira etapa (período de *washout*), os participantes (8 homens saudáveis) retornaram para a unidade hospitalar, tendo sido previamente orientados a não praticar relações sexuais 72 h antes da participação desta etapa do estudo. Conforme explicitado na seção 4.3, o intervalo de duas semanas (336 horas) foi suficiente para a completa eliminação do sofosbuvir e de seu principal metabólito (GS-331007) do organismo desses indivíduos, assegurando total independência entre as fases deste estudo.

Os participantes tomaram, em jejum, um comprimido de 400 mg de sofosbuvir e foram divididos em dois grupos de 4 pessoas de acordo com o tempo de coleta. Em outras palavras, o primeiro grupo foi selecionado para a coleta das amostras (sangue e fluido seminal) no tempo de 1h:30 min e o outro para a coleta no tempo de 5h:00 min. Houve a necessidade dividir os participantes em grupos a fim de viabilizar a obtenção de volumes suficientes da matriz fluido seminal. Em suma, para cada grupo, as amostras clínicas foram coletadas de acordo com o seguinte esquema:

- 4 indivíduos para o tempo de 1h:30 min: participantes 1, 2, 3 e 10;
- 4 indivíduos para o tempo de 5h:00 min: participantes 4, 5, 6 e 11.

No total, foram coletadas 16 amostras clínicas, sendo 8 de sangue (4 amostras no tempo de 1h:30 min e 4 no tempo de 5h:00 min) e 8 de fluido seminal (4 amostras no tempo de 1h:30 min e 4 no tempo de 5h:00 min). Conforme mencionado na seção 4.3.1, o sangue foi centrifugado para obter o plasma sanguíneo. Detalhes sobre as coletas podem ser consultados na seção 3.5.

Os resultados obtidos são apresentados nas seções 4.3.2.1 e 4.3.2.2. Vale sublinhar que as mulheres, indivíduos 7, 8, 9 e 12, não foram incluídas nesta etapa do estudo.

#### *4.3.2.1 Penetração de sofosbuvir no sistema reprodutivo masculino*

Em 01h:30min, a concentração média de sofosbuvir em plasma foi de  $48,29 \pm 32,09$  ng/mL (23,56 a 93,87 ng/mL). Em 05h:00min, a concentração plasmática média foi de 9,84 ng/mL (< LIQ a 17,19 ng/mL). Salienta-se que, apesar da alta sensibilidade das metodologias (LIQ de 0,50 ng/mL), os resultados de duas dentre as quatro amostras de plasma no tempo de 05h:00min foram inferiores a 0,50 ng/mL. Assim, para o tempo de 05h:00min, não foi possível o cálculo do desvio padrão da concentração plasmática.

Em fluido seminal, a concentração média de sofosbuvir foi de  $83,46 \pm 111,00$  ng/mL (16,44 a 248,70 ng/mL) em 01h:30min e de  $10,57 \pm 4,51$  ng/mL (5,34 a 15,30 ng/mL) em 05h:00min. A amostra de fluido seminal do indivíduo 2, tempo de 01h:30min, exibiu resultado superior ao limite superior de quantificação da curva, ou seja, superior a 100 ng/mL. Dessa maneira, a amostra foi diluída, sendo o resultado final apresentado na tabela 49.

No tempo de 1h:30 min, a razão FS/plasma pôde ser calculada para as 4 amostras analisadas, sendo o resultado (em percentual) igual a  $127,47 \pm 92,58$  (69,78 a 264,94). Em 5h:00 min, a razão FS/plasma pôde ser calculada apenas para 2 amostras, sendo resultado (em percentual) de 145,57 (76,67 a 214,46). Novamente, não foi possível o cálculo do desvio padrão da razão de penetração em 5h:00 min, pois o número amostral é inferior a 3.

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 49 e figuras 73 e 74.

Tabela 49 - Sofosbuvir em plasma e FS - concentração e razão de penetração

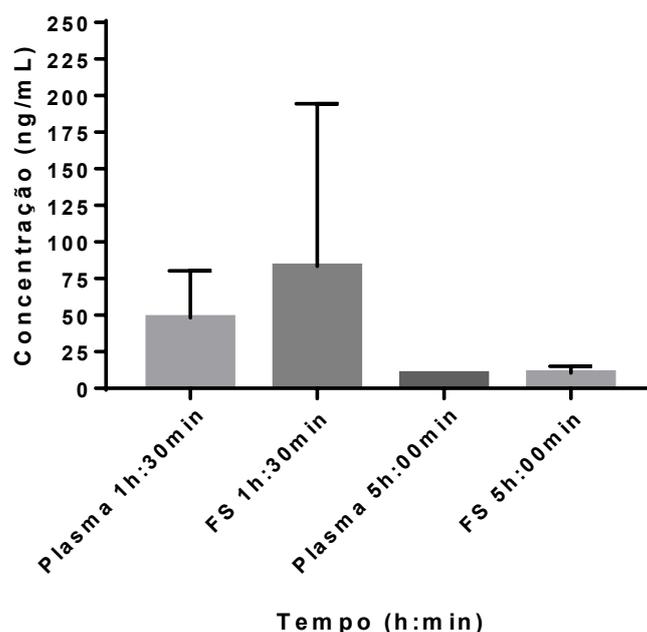
Indivíduo	Sofosbuvir					
	1h:30min			5h:00min		
	Plasma (ng/mL)	FS (ng/mL)	Razão FS/plasma (%)	Plasma (ng/mL)	FS (ng/mL)	Razão FS/plasma (%)
1	47,40	47,38	99,96	NC	NC	-
2	93,87	248,70	264,94	NC	NC	-
3	28,32	21,30	75,21	NC	NC	-
4	NC	NC	-	< LIQ	15,30	-
5	NC	NC	-	< LIQ	8,46	-
6	NC	NC	-	17,19	13,18	76,67
10	23,56	16,44	69,78	NC	NC	-
11	NC	NC	-	2,49	5,34	214,46
<b>Média</b>	48,29	83,46	127,47	9,84	10,57	145,57
<b>Desvio padrão</b>	32,09	111,00	92,58	*	4,51	*
<b>Menor</b>	23,56	16,44	69,78	< LIQ	5,34	76,67
<b>Maior</b>	93,87	248,70	264,94	17,19	15,30	214,46

Legenda: LIQ sofosbuvir em plasma e FS = 0,50 ng/mL; NC: não coletada.

Fonte: (Do autor, 2022). \* Valor não calculado (n = 2).

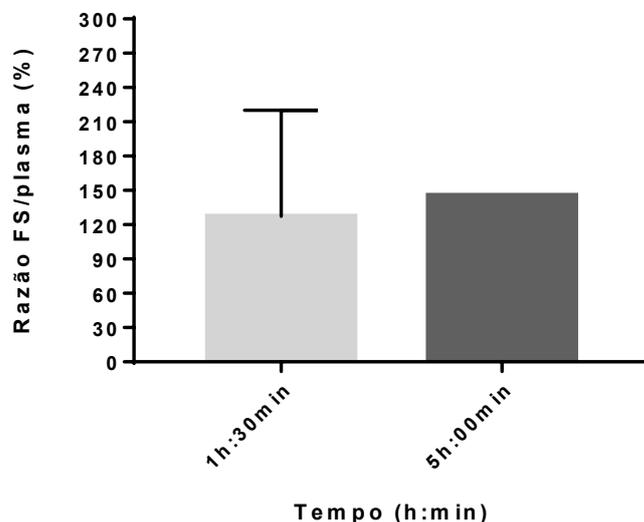
Figura 73 - Sofosbuvir em plasma e FS - concentração

#### CONCENTRAÇÃO DE SOFOSBUVIR EM PLASMA E FLUIDO SEMINAL



Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 74 -Sofosbuvir - razão de penetração no FS

**PENETRAÇÃO DE SOFOSBUVIR NO SISTEMA REPRODUTIVO MASCULINO**

Fonte: (Do autor, 2022).

Assim como foi observado na primeira fase do estudo farmacocinético, as concentrações plasmáticas de sofosbuvir na segunda não estão alinhadas com os dados já disponíveis (622,0 a 1860,1 ng/mL, tabela 1), exibindo valores abaixo do esperado. Conforme apontado na seção 4.3.1.1, existe a possibilidade do tempo de coleta de 1h:30min não corresponder, de fato, ao pico de concentração plasmática ( $C_{max}$ ) do sofosbuvir, sendo necessário, em uma investigação futura, a inclusão e/ou seleção de outros pontos. Aliás, um estudo prévio com o antiviral raltegravir demonstrou que o tempo de coleta possui grande influência na magnitude da penetração (CALCAGNO et al., 2010).

Apesar das baixas concentrações encontradas, foi possível calcular a razão de penetração (divisão entre a concentração em fluido seminal e a concentração em plasma sanguíneo), que auxiliou na análise da penetração de sofosbuvir no sistema reprodutivo masculino. Os dados obtidos sugerem boa penetração de sofosbuvir posto que a média da razão de penetração foi superior a 100 %. Ademais, é possível dizer que esse achado é sugestivo de tendência de acúmulo do fármaco no trato genital masculino, assim como foi observado em um estudo com o tenofovir (VALADE et al., 2017).

Por conseguinte, embora o número de participantes tenha sido reduzido e os resultados tenham apresentado uma alta variabilidade, pode-se afirmar que as evidências fornecidas por este estudo reforçam o caráter promissor do sofosbuvir como opção terapêutica para enfrentamento da Zika, inclusive no combate à transmissão sexual do vírus que pode ter consequências graves como a microcefalia e outros problemas no desenvolvimento cerebral (DUARTE et al., 2021).

No que diz respeito à concentração necessária para causar 50% da inibição da replicação viral (IC<sub>50</sub>), a literatura relata valores de 13,6  $\mu$ M (7200 ng/mL) e 30,9  $\mu$ M (16360 ng/mL), que são superiores à maior concentração encontrada em fluido seminal, ou seja, 248,70 ng/mL (MESCI et al., 2018). Em contrapartida, deve ser levado em consideração que o sofosbuvir é um pró-fármaco e que sua ação antiviral advém da forma trifosforilada GS-461203, que exibiu IC<sub>50</sub> de 0,38  $\mu$ M (201 ng/mL) (SOUZA et al., 2017a). Devido ao fato do metabólito trifosforilado ser encontrado apenas no meio intracelular, sua quantificação não foi objeto deste estudo.

Diante do exposto, visando uma melhor compreensão deste achado, ainda são necessárias novas investigações, incluindo um número maior de indivíduos e pontos de coleta. Além disso, torna-se necessária a inclusão de pacientes acometidos pela doença, pois a integridade da barreira hematotesticular (BHT) pode ser comprometida em indivíduos infectados por Zika, favorecendo uma maior penetração de substâncias no sistema reprodutivo masculino (SILVA, 2018).

#### *4.3.2.2 Penetração de GS-331007 no sistema reprodutivo masculino*

A concentração média de GS-331007 em plasma foi de 435,95  $\pm$  204,09 ng/mL (186,00 a 669,68 ng/mL) em 01h:30min e de 1037,97  $\pm$  310,51 ng/mL (653,99 a 1401,89 ng/mL) em 05h:00min.

Em fluido seminal, a concentração média no tempo de 01h:30min foi de 157,42 ng/mL (< LIQ a 245,22 ng/mL), não tendo sido possível o cálculo do desvio padrão, pois o número amostral foi de apenas 2. Em 05h:00min, a concentração em fluido seminal superou a concentração plasmática, apresentando valor médio de 1285,63  $\pm$  1218,42 ng/mL (258,26 a 2993,74 ng/mL). É importante pontuar que o resultado de 2993,74 ng/mL corresponde a uma amostra que precisou ser diluída e reanalisada,

pois sua concentração foi maior do que o limite superior de quantificação da curva de calibração, isto é, superior a 1500 ng/mL.

A razão FS/plasma para o tempo de 01h:30min pôde ser calculada apenas para duas das quatro amostras analisadas pelo motivo citado no parágrafo anterior, obtendo-se o valor médio percentual de 37,02 (36,62 a 37,43). Em contrapartida, em 05h:00min, o percentual médio da razão de penetração foi de 158,49  $\pm$  201,53 (23,15 a 457,77).

Cabe lembrar que o metabólito GS-331007 não possui ação antiviral. Todavia, é o principal metabólito circulante do sofosbuvir (KIRBY et al., 2015). Além disso, diferentemente do sofosbuvir, ele não é substrato das bombas de efluxo P-gp e BCRP presentes na barreira hematotesticular (KIRBY et al., 2015; MENG et al., 2022). Por outro lado, a forma ativa (GS-461203) está presente apenas no meio intracelular, não sendo possível a sua quantificação em plasma ou fluido seminal (KIRBY et al., 2015).

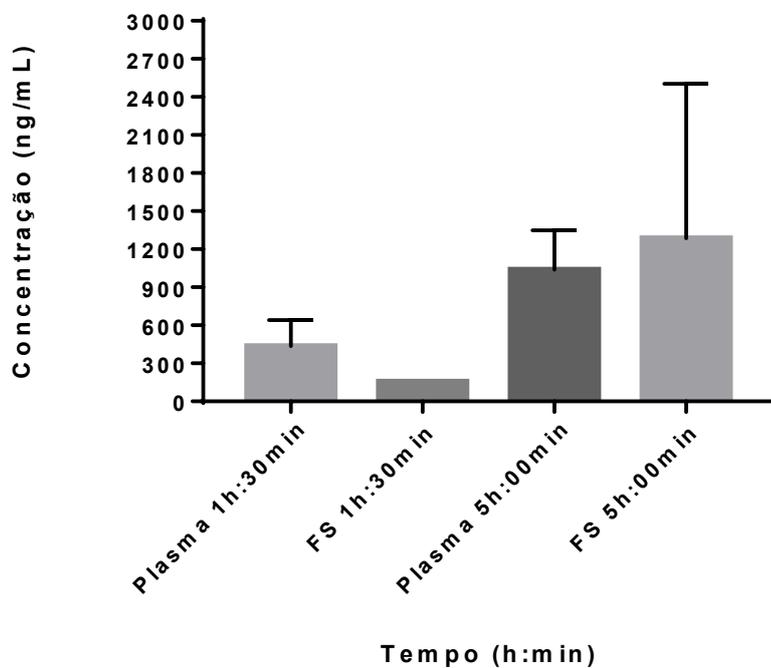
Os resultados obtidos são apresentados na tabela 50 e figuras 75 e 76.

Tabela 50 - GS-331007 em plasma e FS - concentração e razão de penetração

Indivíduo	GS-331007					
	1h:30min			5h:00min		
	Plasma (ng/mL)	FS (ng/mL)	Razão FS/plasma (%)	Plasma (ng/mL)	FS (ng/mL)	Razão FS/plasma (%)
1	381,91	< LIQ	-	NC	NC	-
2	669,68	245,22	36,62	NC	NC	-
3	186,00	69,62	37,43	NC	NC	-
4	NC	NC	-	980,31	592,56	60,45
5	NC	NC	-	653,99	2993,74	457,77
6	NC	NC	-	1115,69	258,26	23,15
10	506,22	< LIQ	-	NC	NC	-
11	NC	NC	-	1401,89	1297,96	92,59
<b>Média</b>	435,95	157,42	37,02	1037,97	1285,63	158,49
<b>Desvio padrão</b>	204,09	*	*	310,51	1218,42	201,53
<b>Menor</b>	186,00	< LIQ	36,62	653,99	258,26	23,15
<b>Maior</b>	669,68	245,22	37,43	1401,89	2993,74	457,77

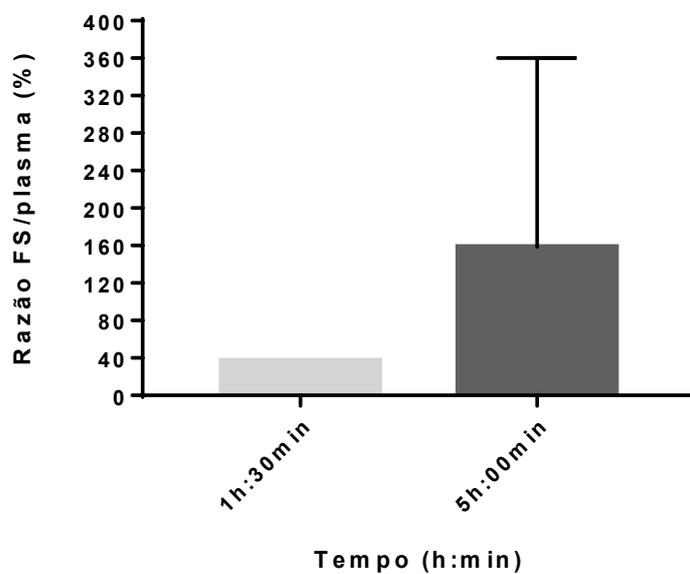
Legenda: LIQ GS-331007 em plasma = 2,00 ng/mL; LIQ GS-331007 em FS = 10,00 ng/mL. NC: não coletada. Fonte: (Do autor, 2022). \* Valor não calculado (n = 2).

Figura 75 - GS-331007 em plasma e FS - concentração

**CONCENTRAÇÃO DE GS-331007 EM PLASMA E FLUIDO SEMINAL**

Fonte: (Do autor, 2022).

Figura 76 - GS-331007 - razão de penetração no FS

**PENETRAÇÃO DE GS-331007 NO SISTEMA REPRODUTIVO MASCULINO**

Fonte: (Do autor, 2022).

Comparando os resultados da matriz plasma com os dados farmacocinéticos já disponíveis, pode-se afirmar que a concentração média no tempo de 5h:00 min, que teoricamente corresponde ao  $t_{max}$ , foi próxima da descrita em literatura, ou seja, próxima da faixa de 1096,9 a 1455,5 ng/mL (tabela 1).

Os achados deste estudo, embora limitados pelo reduzido número de amostras e alta variabilidade, sugerem uma boa penetração de GS-331007 no sistema reprodutivo masculino. Porém, em pesquisas futuras, julga-se apropriada a inclusão ou seleção de outros pontos de coleta para auxiliar na construção de um conhecimento mais aprofundado sobre o tema.

Para finalizar, merece ser apontado que, por diferentes razões, não é possível inferir sobre a origem do metabólito encontrado no sistema reprodutivo masculino: ele pode ter cruzado a barreira hematotesticular, ou pode ter sido produzido pela biotransformação do sofosbuvir, ou ambos os mecanismos podem ter contribuído para sua presença no sistema reprodutivo masculino.

#### 4.3.3 Compilação dos resultados obtidos

A partir das análises das amostras da primeira etapa do ensaio clínico (plasma sanguíneo e líquido de 8 homens e 4 mulheres saudáveis) pode-se concluir que houve baixa penetração de sofosbuvir e de GS-331007 no SNC após a administração, em jejum, de um comprimido do medicamento Sovaldi® (400 mg de sofosbuvir).

A análise das amostras da segunda etapa do ensaio (plasma sanguíneo e fluido seminal de 8 homens saudáveis) sugerem uma boa penetração de sofosbuvir e GS-331007 no sistema reprodutivo masculino após a administração de um comprimido de Sovaldi® em jejum. Deve ser ressaltado que a segunda fase deste estudo foi realizada duas semanas (*washout*) após a primeira, pois esse intervalo foi suficiente para a completa eliminação dos analitos dos organismos dos sujeitos da pesquisa.

## 5 CONCLUSÃO

Considerando os casos de microcefalia e Síndrome de Guillain-Barré (SGB), a Zika ainda é uma ameaça aos sistemas de saúde global, uma vez que, até o momento, não há vacina nem opção terapêutica disponíveis.

Em publicações recentes (2017 - 2020) envolvendo sistemas celulares e animais, foi evidenciado o potencial do sofosbuvir, um antiviral utilizado no tratamento da Hepatite C crônica, contra o vírus da Zika, fomentando, portanto, novas investigações. Entre elas se insere a presente pesquisa, que foi conduzida na busca por dados até então desconhecidos sobre a distribuição de sofosbuvir e seu principal metabólito (GS-331007) para partes do corpo humano acometidas por Zika, tais como os sistemas nervoso central e reprodutivo masculino.

A materialização desta pesquisa se deu por meio do desenvolvimento e validação de metodologias bioanalíticas para quantificação do fármaco e de seu metabólito em diferentes matrizes biológicas (plasma, líquor e fluido seminal). Posteriormente, as metodologias foram aplicadas na análise de amostras de um estudo piloto, que foi o primeiro ensaio clínico com o sofosbuvir com foco em Zika. O ensaio foi realizado em duas etapas independentes e contou com a participação de indivíduos saudáveis que receberam um comprimido de 400 mg de sofosbuvir antes da coleta das amostras biológicas.

Como produto do presente projeto, metodologias inéditas foram desenvolvidas e validadas, viabilizando a quantificação precisa e exata dos compostos de interesse em líquor e fluido seminal. Quanto à quantificação em plasma humano, apesar da existência de publicações sobre o tema, a metodologia desenvolvida exibiu diversas vantagens, tais como: amostras mais limpas antes da injeção no equipamento e menor consumo de matriz biológica e solvente extrator para cada amostra analisada.

Além disso, as metodologias desenvolvidas apresentaram alta sensibilidade e baixo limite inferior de quantificação, propiciando a quantificação simultânea de sofosbuvir e seu metabólito GS-331007 nas amostras do ensaio clínico. Por conseguinte, os resultados obtidos promoveram a ampliação do conhecimento atual, os quais, aliás, são de grande relevância para auxiliar no combate à Zika, que ainda é uma ameaça aos sistemas de saúde considerando os casos graves da doença

(microcefalia e Síndrome de Guillain-Barré) e a inexistência de vacina e tratamento efetivo.

Em suma, pode-se concluir que os objetivos propostos foram plenamente atendidos e os resultados desta pesquisa, em breve, serão publicados e poderão encorajar e nortear novas investigações, permitindo que os sistemas de saúde elaborem respostas rápidas no enfrentamento de novos surtos de Zika.

## REFERÊNCIAS

ABDALLAH, O. M.; ABDEL-MEGIED, A. M.; GOUDA, A. S. Development a validated highly sensitive LC–MS/MS method for simultaneous quantification of Ledipasvir, sofosbuvir and its major metabolite GS-331007 in human plasma: Application to a human pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 143, p. 305–310, 2017.

ARIAUDO, A. et al. A UHPLC-MS/MS method for the quantification of direct antiviral agents simeprevir, daclatasvir, ledipasvir, sofosbuvir/GS-331007, dasabuvir, ombitasvir and paritaprevir, together with ritonavir, in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 125, p. 369–375, 2016.

ANVISA. Resolução nº 27 de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2012.

BECCARIA, M.; CABOOTER, D. Current Developments in LC-MS for Pharmaceutical Analysis. **Analyst**, n. 4, p. 1–46, 2020.

BENAZZATO, C.; RUSSO, F. B.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B. An update on preclinical pregnancy models of Zika virus infection for drug and vaccine discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 17, n. 1, p. 19–25, 2022.

BLUM, F. High performance liquid chromatography. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 75, n. 2, 2014.

BOCCUTO, A. et al. Sofosbuvir selects for drug-resistant amino acid variants in the zika virus RNA-dependent RNA-polymerase complex in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 1–16, 2021.

BORGES, E. D. et al. An update on the aspects of Zika virus infection on male reproductive system. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 36, n. 7, p. 1339–1349, 2019.

CALCAGNO, A. et al. Raltegravir penetration in seminal plasma of healthy volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2744–2745, 2010.

CASS, Q.; CASSIANO, N. **Cromatografia Líquida: Novas Tendências e Aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

CHAE, H. et al. Use of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Clinical Testing in Korean Laboratories : a Questionnaire Survey. **Annals of laboratory medicine**, p. 447–453, 2019.

COLLINS, C. H. Michael Tswett e o “ nascimento ” da Cromatografia. **Scientia Chromatographica**, p. 7–20, 2009.

COMAR, S. R. et al. Análise citológica do líquido cefalorraquidiano. **Estudos de Biologia**, v. 31, n. 73/75, p. 93–102, 2009.

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**, v. 25, n. 13, p. 1–31, 2020.

CROTTI, S. et al. Mass spectrometry in the pharmacokinetic studies of anticancer natural products. **Mass spectrometry reviews**, v. 36, n. 2, p. 213–251, 2015.

CUYCKENS, F. Mass spectrometry in drug metabolism and pharmacokinetics: current trends and future perspectives. **Rapid communications in Mass Spectrometry**, 2018.

DECLOEDT, E. H. et al. Central Nervous System Penetration of Antiretroviral Drugs: Pharmacokinetic, Pharmacodynamic and Pharmacogenomic Considerations. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 54, n. 6, p. 581–598, 2015.

DUARTE, G. et al. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecção pelo vírus Zika. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 30, n. e2020609, p. 1–12, 2021.

ECHEVERRIA, N. et al. Hepatitis C virus genetic variability and evolution. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 6, p. 831–845, 2015.

FANALI, S. et al. **Liquid chromatography : fundamentals and instrumentation**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2013.

FERRARI, D. et al. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of simeprevir, daclatasvir, sofosbuvir, and GS-331007 applied to a retrospective clinical pharmacological study. **Journal of Chromatography B**, v. 1120, n. July, p. 1–7, 2019.

GARDINALI, N. R. et al. Sofosbuvir shows a protective effect against vertical transmission of Zika virus and the associated congenital syndrome in rhesus monkeys. **Antiviral Research**, v. 182, p. 1–19, 2020.

GOODMAN, L. S. et al. **The Pharmacological Bases of Therapeutics**. San Diego: McGraw-Hill Education, 2018.

GUO, J. et al. Zika Virus Infection and Development of Drug Therapeutics. **Applied Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 782–799, 2022.

HAAG, A. M. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. In: MIRZAEI, H.; CARRASCO, M. (Eds.). . **Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications. Advances in Experimental Medicine and Biology.** Switzerland: Springer International Publishing, 2016. v. 919p. 157–169.

HAUGEN, T. B.; GROTMOL, T. pH of human semen. **International Journal of Andrology**, v. 21, n. 2, p. 105–108, 1998.

HOFFMEYER, S. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 7, p. 3473–3478, 2000.

HOPFGARTNER, G. Bioanalytical method validation: How much should we do and how should we document? **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, n. 412, p. 531–532, 2020.

INGLE, R. G. et al. Current development of bioanalytical sample preparation techniques in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2022.

KADIAN, N. et al. Comparative assessment of bioanalytical method validation guidelines for pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 126, p. 83–97, 2016.

KAUPPILA, T. J. et al. Recent developments in atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, v. 36, n. 3, p. 1–27, 2015.

KIRÁLY, M. et al. Mass spectrometry: past and present. **Acta Pharmaceutica Hungarica**, v. 1, n. 86, p. 3–11, 2016.

KIRBY, B. J. et al. Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Drug-Interaction Profile of the Hepatitis C Virus NS5B Polymerase Inhibitor Sofosbuvir. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 54, n. 7, p. 677–690, 2015.

KITAGAWA, S. Liquid Chromatography. **Analytical Sciences**, v. 35, n. September, p. 2018–2019, 2019.

KULKARNI, A. D. et al. Brain-blood ratio: Implications in brain drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 1, p. 85–92, 2016.

KURSCHEIDT, F. A. et al. Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract. **Nature Reviews Urology**, v. 16, n. 4, p. 211–230, 2019.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.

- LAWRENTSCHUK, N.; PERERA, M. **Endotext [Internet]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279008/table/benign-prstate-dsrdr.colourwhit/>>.
- LEDA, A. R. et al. Selective Disruption of the Blood–Brain Barrier by Zika Virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. September, p. 1–14, 2019.
- LI, X. et al. Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of the Direct-Acting Hepatitis C Antiviral Sofosbuvir in Healthy Chinese Subjects. **Clinical Therapeutics**, p. 1–11, 2018.
- LI, Y. et al. Structural characterization of the linked NS2B-NS3 protease of Zika virus. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 591, n. 15, p. 2338–2347, 2017.
- LIMA-OLIVEIRA, G. et al. Sample management for clinical biochemistry assays: Are serum and plasma interchangeable specimens? **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 55, n. 7, p. 480–500, 2018.
- LIU, J. J. et al. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. **American Chemical Society**, p. 3674–3729, 2019.
- LOOS, G.; SCHEPDAEL, A. VAN; CABOOTER, D. Quantitative mass spectrometry methods for pharmaceutical analysis. 2016.
- MAJOR, C. et al. Risk estimation of sexual transmission of Zika virus - United States, 2016 - 2017. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 224, n. 10, p. 1756–64, 2021.
- MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, 2012.
- MASMEJAN, S. et al. Zika Virus. **Pathogens**, v. 11, n. 898, p. 1–14, 2020.
- MATHEW, J.; SANKAR, P.; VARACALLO, M. **StatPearls [Internet]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531504/>>.
- MEAD, P. S.; HILLS, S. L.; BROOKS, J. T. Zika virus as a sexually transmitted pathogen. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 39–44, 2018.
- MENG, Z. et al. Drug transport across the blood-testis barrier. **American Journal of Translational Research**, v. 14, n. 9, p. 6412–6423, 2022.
- MESCI, P. et al. Blocking Zika virus vertical transmission. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.
- MOREIRA, J. et al. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 5, p. 296–305, 2017.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. The mammalian blood-testis barrier: Its biology and regulation. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 5, p. 564–591, 2015.

NIU, Z. et al. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 123–146, 2018.

NOTARI, S. et al. UPLC–MS/MS method for the simultaneous quantification of sofosbuvir, sofosbuvir metabolite (GS-331007) and daclatasvir in plasma of HIV/HCV co-infected patients. **Journal of Chromatography B**, v. 1073, p. 183–190, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021WHO**. Geneva: [s.n.].

OWEN, D. H.; KATZ, D. F. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 4, p. 459–469, 2005.

OZKURT, Z.; TANRIVERDI, E. C. Global Alert: Zika Virus-an Emerging Arbovirus. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 49, n. 2, p. 142–147, 2017.

PAN, C. et al. Simultaneous determination of ledipasvir, sofosbuvir and its metabolite in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1008, p. 255–259, 2016.

PERGOLIZZI, J. et al. The Zika virus: Lurking behind the COVID-19 pandemic? **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 46, n. 2, p. 267–276, 2021.

PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1185–1192, 2016.

PUBCHEM. **Pubchem Compound Summary for sofosbuvir**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/45375808>>. Acesso em: 30 maio. 2022a.

PUBCHEM. **Pubchem Compound Summary for GS-331007 (PSI-6206)**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/psi-6206>>. Acesso em: 30 maio. 2022b.

PUBCHEM. **Pubchem Compound Summary for cimetidine**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cimetidine>>. Acesso em: 30 maio. 2022c.

PUBCHEM. **Pubchem Compound Summary for zidovudine**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/35370>>. Acesso em: 30 maio. 2022d.

PUBCHEM. **Pubchem Compound Summary for diazepam**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3016>>. Acesso em: 30 maio. 2022e.

PUBCHEM. **Pubchem Compound Summary for nicotine**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/89594>>. Acesso em: 30 maio. 2022f.

PUBCHEM. **Pubchem Compound Summary for caffeine**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2519>>. Acesso em: 30 maio. 2022g.

PUBCHEM. **Pubchem Compound Summary for famotidine**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Famotidine>>. Acesso em: 30 maio. 2022h.

RAPPOLD, B. A. Special Considerations for Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Method Development. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 38, n. 3, p. 539–551, 2018.

REZK, M. R.; BASALIOUS, E. B.; KARIM, I. A. Development of a sensitive UPLC-ESI-MS/MS method for quantification of sofosbuvir and its metabolite, GS-331007, in human plasma: Application to a bioequivalence study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 114, p. 97–104, 2015.

RIGO-BONNIN, R. et al. Measurement of total and unbound bicitgravir concentrations in plasma and cerebrospinal fluid by UHPLC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 185, n. 113250, p. 11, 2020.

SAURINA, J.; SENTELLAS, S. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry for metabolite profiling in the field of drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 5, p. 469–483, 2019.

SELCUK, O. et al. Analytical Methods for Determination of Antiviral Drugs in Different Matrices: Recent Advances and Trends. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. May, n. 13, p. 1–32, 2021.

SEMREEN, M. H. et al. Quick and sensitive UPLC-ESI-MS/MS method for simultaneous estimation of sofosbuvir and its metabolite in human plasma. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1–11, 2019.

SEYEN, M. VAN et al. Quantification of second generation direct-acting antivirals daclatasvir, elbasvir, grazoprevir, ledipasvir, simeprevir, sofosbuvir and velpatasvir in human plasma by UPLC-MS/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, p. 1110:15–24, 2019.

SHEN, Z. et al. Pharmacokinetic Profile of a Generic Formulation of Sofosbuvir and Its Metabolite GS-331007 in Healthy Chinese Subjects. **Clinical Pharmacology in Drug Development**, v. 8, n. 8, p. 1073–1080, 2019.

SHI, X. et al. Evaluation of a rapid method for the simultaneous quantification of ribavirin, sofosbuvir and its metabolite in rat plasma by UPLC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1002, p. 353–357, 2015.

SILVA, L. R. C. DA. Zika virus trafficking and interactions in the human male reproductive tract. **Pathogens**, v. 7, n. 2, p. 2–19, 2018.

SONG, B. H. et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 308, p. 50–64, 2017.

SOUZA, T. M. L. et al. The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. **Scientific reports**, v. 7, p. 1–11, 2017a.

SOUZA, T. M. L. et al. Sofosbuvir protects Zika virus-infected mice from mortality, preventing short- and long-term sequelae. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9409, 2017b.

SOUZA, T. M. L. et al. Beyond members of the Flaviviridae family, sofosbuvir also inhibits chikungunya virus replication. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 1–40, 2019a.

SOUZA, T. M. L. et al. Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 1, n. 13, p. 1–22, 2019b.

SOUZA, T. M. L. et al. In vitro antiviral activity of the anti-HCV drugs daclatasvir and sofosbuvir against SARS-CoV-2, the aetiological agent of COVID-19. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 7, p. 1–12, 2021.

URBAN, P. L. Quantitative mass spectrometry: an overview. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 374, p. 1–5, 2016.

VALADE, E. et al. Population Pharmacokinetic Modeling of Tenofovir in the Genital Tract of Male HIV-Infected Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 1–11, 2017.

VAN DEN HOF, M. et al. CNS penetration of ART in HIV-infected children. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 2, p. 484–489, 2018.

WANG, T. et al. Species differences in liver accumulation and metabolism of nucleotide prodrug sofosbuvir. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 35, n. 3, p. 334–340, 2020.

WEBSTER, D. P.; KLENERMAN, P.; DUSHEIKO, G. M. Hepatitis C. **Lancet**, v. 385, n. 9973, p. 1–25, 2016.

WHALEN, K. et al. **Farmacologia Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, 2016. v. 1

XIE, X.; SHI, P. Y. Repurposing an HIV Drug for Zika Virus Therapy. **Molecular Therapy**, v. 27, n. 12, p. 2064–2066, 2019.

XU, H.-T. et al. Evaluation of Sofosbuvir ( $\beta$ -D-2'-deoxy-2'- $\alpha$ -fluoro-2'- $\beta$ -C-methyluridine) as an inhibitor of Dengue virus replication. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

YAN, Z. et al. Isobaric metabolite interferences and the requirement for close examination of raw data in addition to stringent chromatographic separations in liquid chromatography/ tandem mass spectrometric analysis of drugs in biological matrix. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 13, p. 2021–8, 2008.

ZHANG, Y. V. et al. Liquid Chromatography– Tandem Mass Spectrometry An Emerging Technology in the Toxicology Laboratory. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 36, p. 635–661, 2016.

ZHOU, J. et al. The semen pH affects sperm motility and capacitation. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–15, 2015.

ZOU, J.; SHI, P. Strategies for Zika drug discovery. **Current Opinion in Virology**, v. 35, p. 19–26, 2019.

## **ANEXO A —TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

**“Estudo de perfil farmacocinético da formulação de sofosbuvir em diferentes meios humanos, em voluntários sadios, sendo a formulação em estudo o produto referência Sovaldi® comprimido revestido de 400 mg de sofosbuvir, importada e comercializada pela Gilead Sciences Farmacêutica do Brasil Ltda.”**

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

### **NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO**

Este estudo tem por objetivo avaliar a distribuição do sofosbuvir e de seu metabólito GS-331007 no sangue, sêmen e líquido, após administração oral, em jejum e em dose única de 1 comprimido de sofosbuvir 400 mg .

Este medicamento é indicado em associação com outros medicamentos para o tratamento da hepatite C crônica (HCC) em adultos.

Para as mulheres, o teste de gravidez será repetido na noite da internação (HCG na urina). Um teste positivo levará à sua exclusão, devido ao não cumprimento de um requisito do protocolo.

Para o voluntário do sexo masculino que receberá a medicação do estudo:

a) Durante o estudo, você será internado duas vezes, por aproximadamente 24 horas em cada período de internação, com intervalo mínimo de 14 dias entre os períodos.

b) Durante os dois períodos do estudo, você deverá permanecer em jejum por pelo menos 10 horas antes da administração da medicação e, após pelo menos 08 horas de jejum será coletada uma amostra de 30 mL de sangue;

c) No primeiro período do estudo será coletado uma amostra de sêmen de 1 mL e uma amostra de sangue de 7,5 mL antes da administração da medicação. A coleta de sêmen será realizada na noite do confinamento após a internação. No dia seguinte será coleta a amostra de sangue e, em seguida, será administrado um comprimido revestido contendo 400 mg de sofosbuvir com 200 mL de água sem gás. Após a administração da medicação, coletadas 02 amostras de líquido de 7 mL cada amostra de líquido e 02 amostras de sangue de 7,5 mL cada amostra de sangue, em tempos pré-determinados, para posterior dosagem do medicamento. A coleta de líquido será realizada através de uma punção lombar que retira uma pequena quantidade de líquido da coluna (7 mL). Esse procedimento é realizado através da introdução de uma agulha fina em uma região da coluna. Em intervalos regulares, será verificada sua pressão, pulso e temperatura. Serão também servidas refeições padronizadas e bebidas em horários pré-estabelecidos. Você receberá alta do hospital 12 horas após a administração da medicação.

d) No segundo período do estudo será coleta a amostra de sangue e, em seguida, será administrado um comprimido revestido contendo 400 mg de sofosbuvir com 200 mL de água sem gás. Após a administração da medicação serão coletadas no total 02 amostras de sêmen de 1 mL e 02 amostras de sangue de 7,5 mL cada amostra de sangue, em tempos pré-determinados, para posterior dosagem do medicamento. Em intervalos regulares, será verificada sua pressão, pulso e temperatura. Serão também servidas refeições padronizadas e bebidas em horários pré-estabelecidos. Você receberá alta do hospital 12 horas após a administração da medicação

e) Um total de 137,5 mL de sangue será coletado durante todo o estudo (sendo 37,5 mL para quantificação do sofosbuvir, 60 mL para controle analíticos e 40 mL para realização de exames laboratoriais de segurança pré e pós estudo). Será coletado um total de 14 mL de líquido durante todo o estudo, e também será coletado um total de 3 mL de sêmen durante todo o estudo.

f) A duração total de sua participação na pesquisa está estimada em até 30 dias após a última coleta de amostra do 2º período de internação.

Para o voluntário do sexo feminino que receberá a medicação do estudo:

- a) Durante o estudo você será internada uma única vez por aproximadamente 24 horas;
- b) Você deverá permanecer em jejum por pelo menos 10 horas antes da medicação e, após pelo menos 08 horas de jejum, será coletada uma amostra de 30 mL de sangue;
- c) Será retirada uma amostra de líquido através de uma punção lombar que retira uma pequena quantidade de líquido da coluna (7 mL). Esse procedimento é realizado através da introdução de uma agulha fina em uma região da coluna. Será também coletada uma amostra de sangue de 7,5 mL antes da administração da medicação. Logo após, será administrado um comprimido revestido contendo 400 mg de sofosbuvir com 200 mL de água sem gás. Serão coletadas 02 amostras de líquido de 7 mL cada amostra de líquido e 02 amostras de sangue de 7,5 mL cada amostra de sangue, em tempos pré-determinados, para posterior dosagem do medicamento;
- d) Em intervalos regulares, será verificada sua pressão, pulso e temperatura;
- e) Serão também servidas refeições padronizadas e bebidas em horários preestabelecidos;
- f) Você receberá alta do hospital 12 horas após a administração da medicação.
- g) Um total de 92,5 mL de sangue será coletado durante todo o estudo (sendo 22,5 mL para quantificação do sofosbuvir, 30 mL para controle analíticos e 40 mL para realização de exames laboratoriais de segurança pré e pós estudo). Será coletado um total de 14 mL de líquido durante todo o estudo.
- h) A duração total de sua participação na pesquisa está estimada em até 30 dias após a última coleta de amostra do período de internação.

Para o voluntário do sexo masculino que não receberá a medicação do estudo (realizará apenas a doação do líquido):

- a) Durante o estudo você será internado uma única vez por aproximadamente 24 horas;
- b) Você não receberá a medicação do estudo;
- c) Será retirada uma amostra de líquido de 7 mL através de uma punção lombar que retira uma pequena quantidade de líquido da coluna ( 7 mL). Esse procedimento é realizado através da introdução de uma agulha fina em uma região da coluna.
- d) Em intervalos regulares, será verificada sua pressão, pulso e temperatura;
- e) Serão também servidas refeições padronizadas e bebidas em horários pré-estabelecidos. Você receberá alta do hospital 6 horas após a coleta do líquido.
- f) Um total de 07 mL de líquido será coletado durante todo o estudo.
- g) A duração total de sua participação na pesquisa está estimada em até 30 dias após a última coleta de amostra do período de internação.

No final do estudo, você deverá ser submetido à consulta médica e deverão ser coletadas amostras de sangue e urina para repetição de exames laboratoriais. Os exames laboratoriais incluem exame de sangue completo como hemograma completo, bioquímica sanguínea (glicose no sangue, proteínas totais, albumina, bilirrubina total, fosfatase alcalina, transaminases oxalacética e pirúvica, gamaglutamil transferase, creatinina, ureia, ácido úrico, colesterol e triglicérides); exame sumário de urina (Urina I) e para as mulheres, o teste de gravidez (beta-HCG no sangue).

### **RESPONSABILIDADES DO VOLUNTÁRIO**

É condição indispensável, para participação no ensaio clínico, que você esteja em boas condições de saúde e, portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações. Algumas regras deverão ser seguidas para sua participação no estudo: a) não pode ser dependente de drogas ou álcool; b) não pode ter doado sangue ou plasma dentro dos três meses que antecedem o estudo ou ter doado 1500 mL (um litro e meio) no período de um ano

antecedendo ao estudo; c) não pode tomar bebidas contendo toranja (pomelo/grapefruit), cafeína e xantinas (café, chá, coca-cola, etc.) nas 48 horas que antecedem a internação; d) atividade física excessiva deverá ser evitada. Caso você não siga uma ou mais regras citadas acima, você será retirado do estudo.

É ainda de sua responsabilidade em relação à sua participação no ensaio clínico: a) comparecer às internações na data e horários informados; b) contatar o investigador clínico (Dr. Eduardo Abib Júnior ou Dr. Deo Paulo Tosetti) e/ou a coordenadora clínica (enfermeira Silvana Fidelis) em caso de qualquer ocorrência, dúvidas ou necessidade e antes de tomar qualquer decisão por conta própria; c) retornar à Scentryphar nas datas e horários combinados; d) tomar toda a medicação prevista; e) ingerir toda a alimentação e líquidos que tenham sido previstos; f) retornar à unidade na data e horário combinados para a realização da consulta e exames de alta, independentemente de haver sido interrompida sua participação no estudo ou de sua desistência.

Aos voluntários do sexo feminino é condição indispensável para participação no ensaio clínico que não estejam grávidas, isso será comprovado através de exame (HCG - para detecção de gravidez). Sua participação não será permitida caso você engravide após a realização dos exames clínico-laboratoriais, se você estiver amamentando ou se estiver pretendendo engravidar durante o prazo de duração do estudo. Caso, mesmo tendo considerado estas precauções, vier a suspeitar que engravidou durante a participação no estudo, deverá comunicar imediatamente o fato à equipe e deverá interromper sua participação sem prejuízo dos seus direitos.

Autorizar o armazenamento e possível utilização do material coletado (sangue, sêmen e líquido) em pesquisas futuras relacionadas ao desenvolvimento e/ou validação de métodos (técnicas) para ensaios farmacocinéticos ou outros estudos de bioequivalência e biodisponibilidade relativa, desde que as referidas pesquisas tenham sido previamente analisadas e aprovadas por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) credenciado e/ou pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Dispensando desta forma, a necessidade de assinatura de outro Termo de Consentimento nesses casos.

## **RESPONSABILIDADES DA SCENTRYPHAR**

É de responsabilidade do investigador garantir que os voluntários envolvidos recebam um tratamento definitivo para qualquer evento adverso, se necessário. Os eventos deverão ser seguidos clinicamente e por análises laboratoriais (quando indicados) até que os parâmetros voltem ao normal. Estas atividades podem permanecer mesmo após o estudo ter sido finalizado.

A equipe da Unidade Clínica deverá monitorar a segurança dos voluntários desde a ocorrência de um evento adverso até a recuperação satisfatória. Durante o período de internação, em casos de emergência, a unidade tem local próprio, equipado com desfibrilador, monitor, oxímetro, respirador, material para pequena cirurgia e com medicação de urgência para qualquer eventualidade. Além disso, dispõe de uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI).

## **POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS**

De acordo com a bula do medicamento, a administração por via oral de sofosbuvir pode causar as seguintes reações: fadiga (cansaço), cefaleia (dor de cabeça), náusea, insônia (falta de sono, dificuldade para dormir), prurido (sensação de coceira intensa), anemia, astenia (fraqueza, cansaço), erupção cutânea (erupção na pele), redução do apetite, calafrios, sintomas semelhantes à gripe (flu-like), pirexia (estado febril), diarreia, neutropenia (diminuição do número de neutrófilos no sangue), anormalidades exames laboratoriais, elevação bilirrubina, elevações da creatina quinase, elevações da lipase, desordem cardíacas.

Além dos efeitos citados, a administração de qualquer medicamento pode causar reações imprevisíveis.

A retirada de sangue é um procedimento seguro e pode causar um leve desconforto, e ocasionalmente, uma mancha roxa pequena no local da picada, sem maiores problemas.

A retirada de líquido é um procedimento seguro, pode causar dor no local da punção e dores de cabeça.

## **BENEFÍCIOS OU COMPENSAÇÕES**

A participação neste estudo, não tem o objetivo de submetê-lo a um tratamento terapêutico. Conseqüentemente, não se espera que a participação no estudo traga qualquer benefício em função do tratamento.

## **INTERCORRÊNCIAS (efeitos indesejáveis)**

Se você sofrer algum malefício em decorrência direta de sua participação no estudo, você receberá tratamento, sem qualquer custo. Ao assinar este termo, você não está renunciando a qualquer direito legal que você possui.

Ao participar do estudo você terá um seguro de vida (Seguro de Vida em Grupo) pela empresa Porto Seguro CIA de Seguros Gerais, pelo período de 06 meses contados da data da administração da medicação, na primeira internação. Este seguro cobre morte por causa natural, acidental e/ou invalidez por acidente ou doença, desde que você tenha tomado a medicação na primeira internação. Para acionar o seguro você deverá entrar em contato com a Scentryphar, que tomará as providências iniciais junto a seguradora, repassando-lhe todas as informações necessárias para acionamento deste seguro.

## **RESSARCIMENTO**

Os voluntários do sexo masculino que receberem a medicação do estudo e participarem dos dois períodos do estudo serão ressarcidos no valor de R\$ 3.000,00 (três mil reais) relativo às despesas e tempo despendidos durante o estudo.

As voluntárias do sexo feminino que receberem a medicação do estudo e participarem do período do estudo serão ressarcidas no valor de R\$ 2.500,00 (dois mil e quinhentos reais) relativo às despesas e tempo despendidos durante o estudo.

Os voluntários que não receberem a medicação do estudo, apenas doarem o líquido, serão ressarcidos no valor de R\$ 2.000,00 (dois mil reais) relativo às despesas e tempo despendidos durante o estudo.

A desistência ou dispensa antes do comparecimento para a primeira internação não dá direito a ressarcimento.

## **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA**

Sua participação é voluntária e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento em que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador ou a um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento médico. Independente de seu desejo e consentimento, sua participação no ensaio clínico poderá ser interrompida em função: a) da ocorrência de eventos adversos; b) da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo; c) do não cumprimento das normas estabelecidas; d) de qualquer outro motivo que, a critério médico, seja do interesse de seu próprio bem estar ou dos demais participantes; e) da suspensão do Estudo como um todo.

A Scentryphar o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

A interrupção não causará prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento pela equipe da Scentryphar.

## **DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO**

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo. A Scentryphar não identificará o voluntário por ocasião da publicação dos resultados obtidos.

Contudo, o(s) monitor (es) do Estudo, auditor (es), membros do Comitê de Ética em Pesquisa, ou autoridades dos órgãos governamentais envolvidos na fiscalização e acompanhamento do estudo terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, com o propósito de verificar os procedimentos e dados do ensaio, no entanto, sem violar a condição de que tais informações são confidenciais. Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você está também autorizando tal acesso, mesmo se você se retirar do Estudo.

## **CONTATOS E PERGUNTAS**

Caso surja alguma intercorrência, você deverá procurar a unidade de saúde mais próxima da sua residência e após entrar em contato com a Scentryphar através dos telefones (19) 3232-6335; (19) 9-9616-9895 ou com os médicos nos telefones indicados no final deste Termo de Consentimento para esclarecimentos e ajuda na conduta a ser tomada.

Poderá contatar o Dr. Eduardo Abib Júnior para receber informações adicionais relacionadas à pesquisa ou aos seus direitos como voluntário, ou contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Jaguariúna – FAJ (Rodovia Adhemar de Barros – Km 127 – Pista Sul, Jaguariúna-SP) através do telefone (19) 3837-8500 e/ou e-mail: [comite.etica@faj.br](mailto:comite.etica@faj.br) para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico.

Após a reunião junto com a coordenadora do estudo, e após ler este documento, você obteve todas as informações e esclarecimentos necessários para poder decidir conscientemente sobre a participação no referido ensaio clínico.

Se você concorda com as condições do estudo, leia e assine o documento abaixo.

Eu, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ anos, RG \_\_\_\_\_, declaro que li cuidadosamente todo este documento, denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e que tive oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo e também sobre o Estudo. Recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmo estar livre e espontaneamente decidindo participar do Estudo, sob responsabilidade dos médicos / Pesquisadores Dr. Eduardo Abib Júnior e Dr. Deo Paulo Tosetti, coordenadora do centro enfermeira Silvana Fidelis de Souza e coordenadora de estudo Luciana Caroline Silva da Scentryphar Pesquisa Clínica Ltda.

Ao assinar este Termo de Consentimento, eu também estou certificando que toda a informação que eu prestei, incluindo minha história médica, é verdadeira e correta até onde é de meu conhecimento, e declaro estar recebendo uma cópia assinada deste documento.

Ao assinar este Termo de Consentimento, estou autorizando o acesso às minhas informações de saúde aos membros da equipe e aos monitores, auditores, membros do Comitê de Ética em Pesquisa e membros de órgãos regulamentares envolvidos, nas condições descritas acima.