



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GLAUCO CÉZAR FRAGOLA DE FARIA SOARES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
COM UTILIZAÇÃO DE DESSORÇÃO TÉRMICA DE LASER DE
DÍODO ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA
APLICAÇÃO EM UM ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE
LAMOTRIGINA**

Goiânia
2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Glauco César Fragola de Faria Soares

3. Título do trabalho

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO COM UTILIZAÇÃO DE DESSORÇÃO TÉRMICA DE LASER DE DIODO ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA APLICAÇÃO EM UM ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE LAMOTRIGINA

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Carlos Da Cunha, Professor do Magistério Superior**, em 10/12/2025, às 16:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Glauco César Fragola De Faria Soares, Usuário Externo**, em 10/12/2025, às 19:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5849055** e o código CRC **641FF51E**.

GLAUCO CÉZAR FRAGOLA DE FARIA SOARES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
COM UTILIZAÇÃO DE DESSORÇÃO TÉRMICA DE LASER DE
DIODO ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA
APLICAÇÃO EM UM ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE
LAMOTRIGINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Orientador(a): Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Goiânia

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Soares, Glauco Cézar Fragola de Faria
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
COM UTILIZAÇÃO DE DESSORÇÃO TÉRMICA DE LASER DE DIODO
ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA APLICAÇÃO
EM UM ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE LAMOTRIGINA.
[manuscrito] / Glauco Cézar Fragola de Faria Soares. - 2025.
66 f.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Goiânia, 2025.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras.

1. Dessorção térmica por laser de diodo. 2. Farmacocinética. 3.
Bioequivalência. 4. Lamotrigina. 5. Espectrometria de massas. I.
Cunha, Luiz Carlos da, orient. II. Título.

CDU 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata Nº **268** da sessão de Defesa de Dissertação de **Glauco César Fragola de Faria Soares** que confere o título de Mestre em **Ciências Farmacêuticas**, na área de concentração em **Fármacos e Medicamentos**.

Aos **vinte e um dias do mês de outubro de dois mil e vinte e cinco**, a partir das **14:00 horas**, na sala de defesas da Faculdade de Farmácia, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO COM UTILIZAÇÃO DE DESSORÇÃO TÉRMICA DE LASER DE DIODO ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA APLICAÇÃO EM UM ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE LAMOTRIGINA”**. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Professor Doutor Luiz Carlos da Cunha (FF/UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Professor Doutor Danilo Fabrini Maciel Costa Veloso (SEDUC/GO)**, membro titular externo; **Professor Doutor José Realino de Paula (FF/UFG)**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Professor Doutor Luiz Carlos da Cunha (FF/UFG)**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **vinte e um dias do mês de outubro de dois mil e vinte e cinco**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Carlos Da Cunha, Professor do Magistério Superior**, em 23/10/2025, às 08:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jose Realino De Paula, Professor do Magistério Superior**, em 23/10/2025, às 18:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danillo Fabrini Macie Costa Veloso, Usuário Externo**, em 05/11/2025, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5739930** e o código CRC **D1C140AC**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. José Realino de Paula

Vice-Coodenador do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Ana Carolina Kogawa

Goiânia-GO

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Glauco Cézar Fragola de Faria Soares

Orientador(a): Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Professor Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Prof. Dr. José Realino de Paula / Membro Titular

Professor Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Dr. Danilo Fabrini Maciel Costa Veloso / Membro Titular

Professor de Química da Rede Estadual de Goiás.

Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira / Membro Suplente

Professora Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Dr. Leonardo de Souza Teixeira / Membro Suplente

Membro da Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil.

Data: 21 de outubro de 2025

Desenvolvimento e validação de método analítico com utilização de dessorção térmica com laser de diodo acoplado a espectrometria de massas para aplicação em um estudo de bioequivalência de lamotrigina.

Glauco César Fragola de Faria Soares, Luiz Carlos da Cunha¹

¹Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás - UFG.

Introdução: A lamotrigina é um antiepilético muito utilizado, monitorar níveis plasmáticos é essencial em estudos de bioequivalência. Os métodos convencionais de cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas triplo quadrupolo demandam preparo de amostra complexo e longos tempos de análise. Assim, justifica-se o desenvolvimento de alternativas rápidas e robustas, como a dessorção térmica por laser de diodo acoplado a espectrometria de massas triplo quadrupolo para aplicação em quantificação de fármacos. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho é conseguir desenvolver e utilizar um método de dessorção térmica por laser de diodo acoplado a espectrometria de massas triplo quadrupolo em um estudo de bioequivalência de lamotrigina. **Métodos:** Foram realizados testes de extração, ajustes da fonte de laser, aplicação de testes modernos para avaliação de estabilidades e validação analítica, com aplicação em amostras reais de participantes de pesquisa. **Resultados e Discussões:** O método desenvolvido mostrou extração simples a partir de apenas 50 µL de plasma com utilização de carbamazepina como padrão interno, alta reprodutibilidade e tempo de análise extremamente reduzido (10 segundos por amostra). Houve eliminação do uso excessivo de solventes, e redução significativa no tempo total da etapa analítica, eliminação da necessidade de utilização de coluna cromatográfica, sem geração de efeito matriz, mantendo a robustez do ensaio de bioequivalência. **Conclusão:** Os parâmetros farmacocinéticos obtidos foram consistentes com dados da literatura, demonstrando que a técnica de dessorção térmica por laser de diodo pode substituir a cromatografia líquida com maior eficiência e velocidade quando acopladas a espectrometria de massas, sem comprometer a qualidade dos resultados.

Palavras-chave: dessorção térmica por laser de diodo, farmacocinética, bioequivalência, lamotrigina, espectrometria de massas, métodos bioanalíticos.

Agradecimentos: CNPq, CAPES e FAPEG.

Development and validation of an analytical method using laser diode thermal desorption coupled to mass spectrometry for application in a lamotrigine bioequivalence study

Glauco César Fragola de Faria Soares, Luiz Carlos da Cunha¹

¹Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás - UFG.

Introduction: Lamotrigine is a widely used antiepileptic drug, and monitoring plasma levels is essential in bioequivalence studies. Conventional methods of liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry require complex sample preparation and long analysis times. Thus, the development of fast and robust alternatives is justified, such as laser diode thermal desorption coupled to triple quadrupole mass spectrometry for application in drug quantification. **Objective:** The objective of this work is to develop and use a laser diode thermal desorption method coupled to triple quadrupole mass spectrometry in a bioequivalence study of lamotrigine. **Methods:** Extraction tests, laser source adjustments, application of modern tests for stability evaluation and analytical validation were carried out, with application in real samples from research participants. **Results and Discussions:** The developed method showed simple extraction from only 50 µL of plasma using carbamazepine as the internal standard, high reproducibility, and extremely reduced analysis time (10 seconds per sample). There was elimination of excessive solvent use, a significant reduction in the total analytical stage time, elimination of the need for chromatographic column use, no matrix effect, while maintaining the robustness of the bioequivalence assay. **Conclusion:** The pharmacokinetic parameters obtained were consistent with literature data, demonstrating that the laser diode thermal desorption technique can replace liquid chromatography with greater efficiency and speed when coupled to mass spectrometry, without compromising the quality of the results.

Keywords: laser diode thermal desorption, pharmacokinetics, bioequivalence, lamotrigine, mass spectrometry, bioanalytical methods.

Acknowledgements: CNPq, CAPES e FAPEG.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural da lamotrigina.	18
Figura 2: Esquema de um quadropolo moderno.....	23
Figura 3: Esquema de um espectrômetro triplo quadropolo.....	23
Figura 4: Funcionamento da tecnologia dessorção térmica por laser de diodo.....	25

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por me fortalecer e guiar em cada dia desta jornada.

Agradeço imensamente à minha esposa e companheira de lutas e aflições, Dra. Saadyla Moreira Gomes Fragola, que, em meio aos seus afazeres como mãe dedicada e veterinária exemplar, ainda assim encontrava forças para me suportar e amparar nos dias mais difíceis.

Agradeço aos meus amorosos pais, Geralda de Faria Soares e Luiz Carlos Soares, que sempre me incentivaram a estudar mais e me deram suporte para alcançar meus objetivos. Sou também profundamente grato por todo o amparo e ajuda com meus filhos, Felipe Moreira Fragola e Henrique Moreira Fragola.

Agradeço ainda ao meu irmão Marco Túlio Fragola de Faria Soares, que, com a música, sempre me ajudava a reencontrar direção e serenidade nos dias difíceis. E ao meu tio Vilmar de Faria, por seu exemplo e incentivo constante a seguir estudando e buscando conhecimento.

Agradeço ao professor Luiz Carlos da Cunha, por seus sábios conselhos e por me direcionar a desenvolver um projeto no qual eu me sentisse à vontade e confiante.

De coração, agradeço ao meu amigo Iram Moreira Mundim, por me proporcionar inúmeras oportunidades de crescimento no ICF, sempre exigindo, mas também ensinando, discutindo resultados e oferecendo conselhos valiosos nos momentos difíceis.

Falando em ICF, não posso deixar de agradecer ao CEO, Dr. Leonardo de Souza Teixeira, pelo incentivo constante e por me ensinar que o embate nem sempre é o melhor caminho.

Agradeço também a cada companheiro do setor bioanalítico do ICF pela parceria e cumplicidade — sintam-se todos representados e abraçados nas figuras de Richard Cruz da Silva Vargas e Denys Pires Ferreira.

E um agradecimento especial ao meu grande amigo Danillo Fabrini Maciel Costa Veloso, que conheci no ICF há mais de 15 anos e que foi fundamental para que eu conseguisse concluir este trabalho. Sem você, eu não teria conseguido, magnata!

Por fim, agradeço a cada professor da Faculdade de Farmácia, com quem tive o privilégio de aprender, e em especial à Professora Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira, que tive a felicidade de ter não apenas como professora, mas também como amiga.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CQA	Controle de Qualidade Alto
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
ECCD	Estabilidade de Ciclos de Congelamento e Descongelamento
ECD	Estabilidade de Curta Duração
ELD	Estabilidade de Longa Duração
EPP	Estabilidade Pós Processamento
FDA	Agência de Alimentos e Medicamentos dos EUA
ICH	Conselho Internacional de Harmonização
IS	Padrão Interno
LAM	Lamotrigina
LC	Cromatografia Líquida
LDTD	Dessorção Térmica por Laser de Diodo
MS/MS	Espectrometria de Massas Triplo Quadrupolo
LLE	Extração Líquido-Líquido
LIQ	Limite Inferior de Quantificação (LIQ)
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MTBE	Éter Metil-terc-butílico
PK	Farmacocinética
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 EPILEPSIA: ASPECTOS CLÍNICOS SOCIAIS E TERAPÊUTICOS.....	15
2.2 LAMOTRIGINA: CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS E APLICAÇÕES CLÍNICAS.	17
2.3 ETAPA ANALÍTICA EM ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA: DESAFIOS E AVANÇOS.	19
2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA BIOANÁLISE: DOS FUNDAMENTOS À INOVAÇÃO COM LDTD-MS/MS.	21
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 MATERIAIS	28
4.1.1 Substâncias e reagentes	28
4.1.2 Equipamentos e utensílios diversos.....	28
4.2 MÉTODOS	29
4.2.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES EM SOLVENTE E EM PLASMA, CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS.	29
4.2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	30
4.2.2.1 Extração por precipitação de proteínas	30
4.2.2.2 Extração líquido-líquido com MTBE	31
4.2.3 DESCRIÇÃO DOS TESTES DE VALIDAÇÃO.....	32
4.2.3.1 Seletividade	32
4.2.3.2 Efeito matriz.....	32

4.2.3.3 Efeito residual	33
4.2.3.4 Linearidade, Precisão e Exatidão	34
4.2.3.5 Estabilidade de curta duração (ECD)	34
4.2.3.6 Estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento (ECCD)	35
4.2.3.7 Estabilidade Pós-Processamento (EPP)	35
4.2.3.8 Estabilidade de Longa duração (ELD)	36
4.2.4 APLICAÇÃO CLÍNICA DO MÉTODO EM UM ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO	40
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
APÊNDICE A – Graphical abstract	54
APÊNDICE B – Artigo publicado	55

A epilepsia é uma condição neurológica crônica que afeta milhões de pessoas ao redor do globo, causando um impacto considerável tanto no âmbito clínico quanto social. Dentre os medicamentos disponíveis, a lamotrigina é uma boa opção pelo seu extenso uso no tratamento de epilepsia e transtorno bipolar, graças à sua eficácia clínica, excelente perfil de segurança e farmacocinética relativamente estável. Em estudos de bioequivalência, o acompanhamento dos níveis plasmáticos é essencial para garantir a eficácia terapêutica e reduzir os riscos para o paciente (SEGURA et al., 2022).

Devido à sua sensibilidade e seletividade, os métodos de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS) tornaram-se o padrão ouro em bioanálises quantitativas, apesar de exigirem um preparo de amostra complexo, uso moderado de solventes e tempos de análise prolongados (MATUSZEWSKI et al., 2003; CHAMBERS et al., 2021). Embora analisadores de alta resolução, como orbitrap e q-TOF (espectrômetro de tempo de voo), sejam amplamente empregados em identificação estrutural, o triplo quadrupolo mantém-se como instrumento de escolha em quantificação de fármacos, pela robustez, ampla faixa dinâmica e alta seletividade obtida a partir das transições Q1/Q3 (DONGEN; NIESSEN, 2012).

Dentro deste contexto, a desorção térmica por laser de diodo acoplada a espectrometria de massas triplo quadrupolo (LDTD-MS/MS) surge como uma alternativa inovadora e eficiente. A técnica dispensa o uso de coluna cromatográfica e fase móvel, reduz o consumo de reagentes e permite análises ultrarrápidas, da ordem de segundos, mantendo precisão e robustez em matrizes complexas (SEGURA et al., 2022; KIYONAMI et al., 2011).

Esses avanços representam um marco na evolução da espectrometria de massas aplicada à bioanálise desde a introdução da ionização por eletrospray (FENN et al., 1989), ampliando as possibilidades de abordagens mais sustentáveis em estudos de bioequivalência e biodisponibilidade. Ao mesmo tempo, têm impulsionado o uso do LDTD-MS/MS em estudos farmacocinéticos, sobretudo em cenários que

exigem alto rendimento analítico e grande número de amostras em pouco tempo. A eliminação da etapa cromatográfica e o tempo de análise de apenas alguns segundos tornam a técnica especialmente atrativa para estudos de bioequivalência que requerem quantificação rápida e precisa. Estudos recentes demonstram que o LDTD-MS/MS oferece seletividade adequada, boa repetibilidade e limites de quantificação compatíveis com aplicações clínicas (PICARD et al., 2008; WU et al., 2007; BYNUM; MOORE; GRABENAUER, 2014; SEGURA; PERRIER; SAUVÉ, 2022). Assim, o LDTD-MS/MS se destaca como alternativa promissora para análises ultrarrápidas em farmacocinética humana, mantendo a confiabilidade necessária em contextos regulatórios.

Este trabalho apresenta o desenvolvimento, validação e aplicação de um método baseado em LDTD-MS/MS para determinação de lamotrigina em plasma humano, demonstrando sua viabilidade como alternativa rápida, seletiva e robusta em relação à LC-MS/MS, com potencial para otimizar estudos de bioequivalência, apoiar monitoramento clínico de pacientes e reduzir o uso de solventes, contribuindo para processos mais sustentáveis na indústria farmacêutica.

2.1 EPILEPSIA: ASPECTOS CLÍNICOS SOCIAIS E TERAPÊUTICOS

Epilepsia pode ser definida com uma condição ou doença neurológica, geralmente crônica, com característica de predisposição recorrente do cérebro em gerar crises epiléticas. Essas crises são resultado de descargas elétricas neurais fora do padrão definido como normal, excessivas, muitas vezes sincronizadas. Elas podem afetar o comportamento, a consciência, os sentidos ou os movimentos corporais do paciente. As condições clínicas são extremamente variáveis e podem incluir convulsões tônicas, clônicas, mioclônicas, ausências e atonias, entre outras (FISHER et al., 2014; SHORVON, 2011).

Dados atuais estimam cerca de 50 milhões de pessoas no mundo sofrem com epilepsia, o que coloca esta doença entre as mais comuns doenças neurológicas do planeta. Os registros da organização mundial da saúde sugerem que 80% dos casos ocorra em países de baixa ou média renda per capita, a onde o acesso a ao diagnóstico e tratamento adequado são fatores limitantes. Por esse conjunto de fatores a epilepsia acaba sendo um problema global de saúde pública. (World Health Organization, 2019).

Infelizmente as ocorrências das crises epiléticas interferem significativamente na qualidade de vida dos portadores de epilepsia. Muitas vezes os pacientes tem limitações ou restrições de tarefas comuns do cotidiano de uma vida moderna, limitando acesso a trabalho, educação e relações sociais. Bishop e Allen (2003) realizaram um estudo qualitativo, onde descrevem que a epilepsia pode impor ao paciente afetado estigmas sociais, insegurança, medo e afetar de maneira negativa a vida e o emocional. Já que por muitas vezes o indivíduo afetado sofre preconceito dentro da própria família e seu ciclo de convívio social, e mesmo que não excluído, o paciente se sente assim, como um peso ou problema, o que dificulta ainda mais sua lotação no mercado de trabalho ou atividades pedagógicas como por exemplo cursar universidade, o que acaba por gerar solidão, afastamento e marginalização.

Outro ponto a se destacar é como a doença pode interferir na saúde mental do paciente, desencadeando outras doenças como ansiedade, depressão, pânico, alterações de humor e bipolaridade, doenças essas mais frequentes em pessoas com

epilepsia do que na população geral (ZUBERI e SYMONDS, 2015). Esses aspectos reforçam a necessidade de um acompanhamento multidisciplinar a estes pacientes, além do neurologista, profissionais da psicologia, psiquiatria, serviço social e educação são necessários para um acompanhamento adequado destes pacientes.

A melhor escolha para tratamento da epilepsia ainda é o uso de medicamentos contínuos, sendo estes responsáveis por cerca de 70% da eficácia em controle de crises epiléticas. Para os outros 30% de pacientes afetados pela epilepsia, muitas vezes são necessários outros tratamentos como dietas cetogênicas, cirurgias ou neuroestimulação. Neste contexto, desenvolver diagnóstico rápidos e tratamentos adequados são necessários para mudar e melhorar as condições dos indivíduos acometidos por esta enfermidade. (PETERLE et al., 2025)

Com essa perspectiva, a disponibilidade de novos medicamentos, mais acessíveis e viáveis para o controle da doença se torna um divisor de águas para adesão e controle das crises. Medicamentos similares e genéricos de qualidade, podem gerar alternativa viável a pacientes que não estejam adaptados ao uso de drogas mais antigas, ou medicamentos as vezes inespecíficos em cada caso. Por isso estudos de bioequivalência e biodisponibilidade precisam ser cada vez mais confiáveis, rápidos e acessíveis. Afim de ajudar a cadeia produtiva a facilitar o acesso a novas drogas e tratamentos. Porém, estes estudos, dependem diretamente de métodos bioanalíticos seguros, para execução da etapa analítica dos testes já citados, conforme orientação de agências reguladoras como FDA, ANVISA, EMA, ICH que estabelecem critérios rigorosos de validação para garantir a precisão e exatidão dos dados analisados em estudos farmacocinéticos e bioequivalência. (MASTAN, LATHA e AJAY, 2011)

Os aspectos sociais, clínicos e científicos da epilepsia precisam ser entendidos e levados em consideração como uma justificativa para o desenvolvimento e inovação de novos medicamentos, novos métodos analíticos. Com intuito de popularizar e levar acesso seguro e confiável de novas alternativas de tratamento a pacientes que sofrem com essa condição, tendo como objetivo central melhorar e diminuir mortalidade, socialização e bem estar. (WAHAB, 2010)

Como mencionado anteriormente, o uso de medicamentos para tratamento e controle da epilepsia é a via principal e primeira escolha na maioria dos casos. A escolha do fármaco depende de múltiplos fatores, como tipo de crise, síndrome epilética, idade do paciente, comorbidades, efeitos adversos e interações medicamentosas. Estão no mercado atualmente mais de vinte fármacos antiepiléticos aprovados para uso clínico, separados por primeira ou segunda geração quanto ao seu desenvolvimento, cada droga possui um mecanismo de ação específico. Programas como o Anticonvulsant Screening Program e iniciativas subsequentes contribuíram para o desenvolvimento de mais de 18 novos medicamentos nos últimos 25 anos, ampliando significativamente as opções terapêuticas disponíveis. (KIM et al., 2020; RHO e WHITE, 2018).

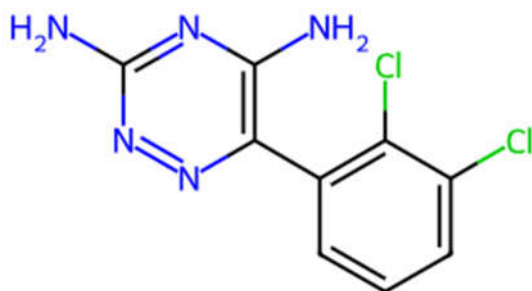
A modulação e regulação de canais iônicos, e modulação de neurotransmissores sejam de glutamato ou inibidores do ácido gama-aminobutírico costumam ser os mecanismos de ação com mais eficiência em controle das crises epiléticas. Fármacos muito utilizados inicialmente no século XX como fenitoína ou carbamazepina tem sido substituído gradativamente por fármacos mais modernos como levotiracetam, topiramato, lacosamida, lamotrigina entre outros. Estes mais modernos têm apresentado efeitos adversos menores ou mais brandos, diminuindo também as interações farmacológicas e apresentando melhores perfis farmacocinéticos. (FRENCH e FEE, 2011).

2.2 LAMOTRIGINA: CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS E APLICAÇÕES CLÍNICAS.

A lamotrigina (Figura 1) um fármaco antiepilético de segunda geração, possui massa molecular média de $256,090 \text{ g.mol}^{-1}$, e fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_7\text{Cl}_2\text{N}_5$. (CHEMSPIDER, 2025). Possui seu mecanismo de ação ligado ao bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem, além de alguma relação inibitória do glutamato. Costuma ser um fármaco eficaz em crises epiléticas parciais, crises generalizadas do tipo tônico-clônicas e crises de ausência. Apresenta uma boa faixa terapêutica, que lhe garante uso seguro e bem tolerado, além de ser eficaz em casos de bipolaridade.

Este fato torna a lamotrigina um antiepiléptico que não costuma induzir a depressão e nem a grandes transtornos psíquicos. (GLAUSER et al., 2013; KANNER et al., 2018).

Figura 1: Fórmula estrutural da lamotrigina.



Adaptado de CHEMSPIDER, 2025

A farmacocinética da lamotrigina tem sido bem estudada e na literatura consta que sua absorção por via oral é alta chegando a aproximadamente 98% da dose. Além disso, apresenta um baixo metabolismo pré-sistêmico, sendo sua metabolização principal por glucuronização hepática com predominância da via UGT1A4. Possui uma meia-vida de eliminação variável entre 24 e 35 horas segundo a bula do medicamento referência hoje no mercado. Além disso, a bula também afirma que a meia vida é fortemente influenciada quando outros medicamentos são administrados concomitantemente. (GLAUSER et al., 2013; GLAXOSMITHKLINE BRASIL LTDA., 2025).

Clinicamente, a lamotrigina é bem tolerada e muito segura se comparada a outros antiepilépticos, sua absorção não está associada a efeitos sedativos como alguns outros fármacos. Outro ponto favorável é o baixo comprometimento cognitivo dos pacientes tratados com lamotrigina. No entanto, seu uso exige precauções devido

à possibilidade de reações cutâneas graves, incluindo síndrome de Stevens-Johnson, particularmente em regimes de escalonamento rápido ou em associação com valproato. A introdução lenta e gradual é, portanto, uma recomendação padrão nas diretrizes terapêuticas internacionais. (GUBERMAN et al., 1999).

2.3 ETAPA ANALÍTICA EM ESTUDOS DE BIOEQUIVALÊNCIA: DESAFIOS E AVANÇOS.

A etapa analítica em estudos de bioequivalência ou biodisponibilidade costuma ser um desafio por si só. Detectar e quantificar o fármaco de interesse com qualidade depende muito do tipo de matriz biológica, que quase sempre cria dificuldades próprias. Não existem métodos farmacopeicos específicos para cada situação, e cada estudo acaba exigindo algum ajuste particular durante o desenvolvimento. No geral, trabalha-se com plasma humano, uma matriz complexa, cheia de proteínas, lipídeos, sais e outras substâncias endógenas que podem interferir de diferentes maneiras. Por isso, ter um método realmente capaz de entregar precisão, exatidão, linearidade e boa confiabilidade é essencial para gerar dados farmacocinéticos coerentes — especialmente agora, com fármacos administrados em doses menores e limites de quantificação que, há alguns anos, eram praticamente impensáveis (FDA, 2018; ICH, 2022; BRASIL, 2012).

Um dos pontos que mais afeta o desempenho de qualquer método é o efeito matriz. Ele pode aumentar ou diminuir a resposta analítica dependendo da interação do analito com os componentes presentes no plasma. Isso, se não for avaliado e controlado, acaba prejudicando a seletividade e a exatidão da análise. Entender como o fármaco se comporta na matriz e identificar possíveis interferências é parte fundamental para evitar distorções nos resultados (CHAMBERS et al., 2007; MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 1998).

A partir desse entendimento, entra o preparo da amostra, que é praticamente o coração do método quando se pensa em reduzir o efeito matriz. Dependendo das características do fármaco e do nível de sensibilidade que se deseja, pode ser necessário recorrer a técnicas como precipitação de proteínas, extração líquido-líquido ou extração em fase sólida. A escolha depende do estudo, da matriz e até da

rotina do laboratório. No fim, o método precisa combinar seletividade, boa sensibilidade, tempo de análise que faça sentido e um rendimento que dê conta do número de amostras sem comprometer o fluxo analítico (CHAMBERS et al., 2007; MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 1998).

Nos estudos de bioequivalência, as amostras vêm de voluntários que recebem uma dose única do medicamento teste e outra do medicamento referência. O desenho é cruzado e randomizado, justamente para diminuir a variabilidade interindividual e evitar efeito de sequência. Entre um período e outro, respeita-se o washout, o tempo necessário para que o fármaco administrado antes seja completamente eliminado e não interfira nos resultados seguintes (EMA, 2010). É nesse momento que o método bioanalítico entra em ação de fato, porque todas as concentrações plasmáticas usadas no cálculo dos parâmetros farmacocinéticos dependem diretamente da qualidade dessa etapa.

A etapa analítica pode ser conduzida de diferentes maneiras. Até meados da década de 1980, era comum o uso de cromatografia líquida com detectores de ultravioleta ou fluorescência, que funcionavam dentro das limitações da época. A partir da introdução da ionização por eletrospray, descrita por Fenn et al. (1989), houve uma mudança significativa. A espectrometria de massas começou a ganhar espaço ao longo da década de 1990, oferecendo seletividade muito maior, velocidade superior e sensibilidade que se tornou um divisor de águas para análises bioanalíticas.

Com o tempo, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) acabou se consolidando como o padrão ouro para quantificação de fármacos em plasma em estudos de bioequivalência. A técnica se mostrou extremamente robusta, com ampla faixa dinâmica e excelente desempenho para matrizes biológicas complexas, o que a tornou praticamente indispensável na área (KORFMACHER, 2005).

Hotha et al. (2012) validaram método LC-MS/MS para lamotrigina em plasma humano com faixa de 5 - 2000 ng/mL, aplicável a estudos farmacocinéticos. De forma semelhante, Wong et al. (2015) reportaram linearidade de 8 - 10.000 ng/mL em método rápido e robusto, enquanto Zhou et al. (2022) aplicaram LC-MS/MS em pacientes com epilepsia, confirmando a adequação do uso dessa abordagem para monitoramento

terapêutico. Mais recentemente, Shi et al. (2024) reforçaram a confiabilidade da quantificação plasmática por UHPLC-MS/MS frente a imunoensaios.

2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA BIOANÁLISE: DOS FUNDAMENTOS À INOVAÇÃO COM LDTD-MS/MS.

A espectrometria de massas é uma técnica que se baseia na ionização da substância de análise para que a mesma seja analisada e detectada através de sua razão massa/carga (m/Z). Sua origem está ligada a equipamentos utilizados por J. J. Thomsom conhecido como espectrógrafo de massas no ano de 1912 e que permitiu provar a existência de isótopos estáveis. Seu aprimoramento um pouco mais tarde em 1919 por Francis Willian Aston gerou o espectrômetro de massas por tempo de voo e proporcionou seu prêmio Nobel em 1922. (MAHER, JJUNJU e TAYLOR, 2015) (HUGHES, 2009).

Diversos são os tipos de espectrômetros de massas modernos, sendo os principais modelos os equipamentos de tempo de voo (TOF ou q-TOF), os de triplo quadruplo (MS/MS), os orbitrap entre outros. Todos estes detectam razões massa carga, contudo analisadores do tipo TOF ou q-TOF e os orbitrap são equipamentos com uma resolução de massas muito maior que os de triplo quadruplo. Por este motivo são classificados como equipamentos de alta resolução, mas normalmente tem uma limitação ao trabalhar com faixas dinâmicas extensas e linearidades com variação acima da quarta ordem de grandeza. São muito mais utilizados em estudos de elucidação estrutural, análise proteômica ou grandes massas moleculares intactas. (DILLEN et al., 2012; CHAMBERS et al., 2007)

Os espectrômetros de alta resolução, como orbitrap e q-TOF, têm um papel muito forte quando o objetivo é identificar compostos desconhecidos ou entender estruturas com mais detalhe. Eles trabalham com uma resolução bem maior e conseguem separar íons que diferem muito pouco em m/z , o que ajuda bastante em análises de caracterização e em estudos mais exploratórios. Em resumo, são

excelentes quando se precisa de precisão de massa realmente alta (KORFMACHER, 2005).

Já quando falamos de quantificação em bioanálises, principalmente quando envolve plasma humano e muitos pontos de coleta, como é o caso dos estudos de bioequivalência, o cenário muda um pouco. Nesse tipo de aplicação, os equipamentos de resolução unitária acabam atendendo melhor. Os espectrômetros do tipo triplo quadrupolo, apesar de não terem a mesma resolução dos de alta resolução, usam três quadrupolos alinhados e uma célula de colisão no quadrupolo central, o que permite trabalhar com faixas dinâmicas muito amplas. Isso faz bastante diferença para quantificar compostos em concentrações muito distintas dentro da mesma corrida (VAN DONGEN; NIESSEN, 2012).

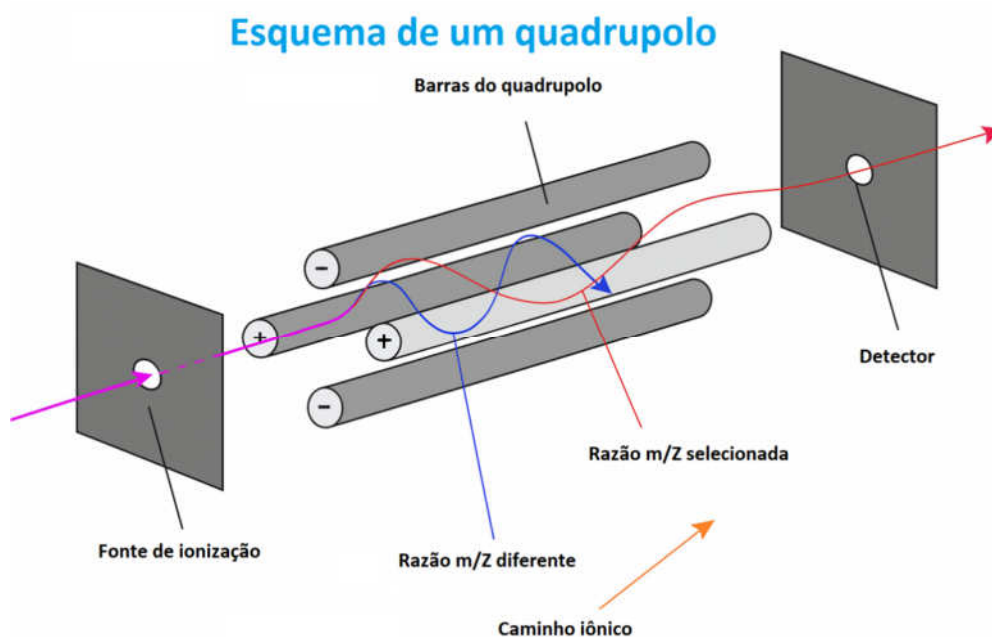
Outro ponto importante é a própria forma como o triplo quadrupolo opera. A seleção do íon precursor em Q1 e do íon fragmento em Q3, formando as transições monitoradas em MRM, garante uma seletividade excelente mesmo em matrizes complexas. Esse mecanismo, aliado ao processo de fragmentação controlada, foi o que permitiu à técnica se consolidar como padrão para quantificação em LC-MS/MS e, mais recentemente, também em abordagens sem separação cromatográfica, como o LDTD-MS/MS (FENN et al., 1989; VAN DONGEN; NIESSEN, 2012). Figura 2 é mostrado o quadrupolo utilizado em equipamentos modernos, e na Figura 3 aparece o esquema geral de operação de um sistema triplo quadrupolo.

Matuszewski, nasiri e chambers apresentaram pontos relevantes para tentar contornar efeitos matriz no uso de cromatografia acoplada a espectrometria de massas na busca por métodos lineares, exatos e precisos. Realmente o uso de padrões internos marcados isotopicamente com a função de minimizar ou compensar oscilações instrumentais, adoção de medidas como diminuição do volume de matriz, escolha adequada de fases estacionárias, condições de extração realmente são pontos cruciais ao trabalhar com LC-MS/MS. (MATUSZEWSKI et al., 2003; NASIRI et al., 2021; CHAMBERS et al., 2007)

Mas tudo isso pode ser contornado, e a quantificação de amostras provenientes de matrizes complexas como plasma humano podem ser realizadas de maneira seletiva, exata, precisa, linear e robusta sem a utilização de sistema cromatográfico,

ao invés disso o uso de uma fonte denominada Laser Diode Thermal Desorption (dessorção térmica por laser de diodo) acoplada a espectrometria de massas triplo quadrupolo. (BYNUM; MOORE; GRABENAUER, 2014).

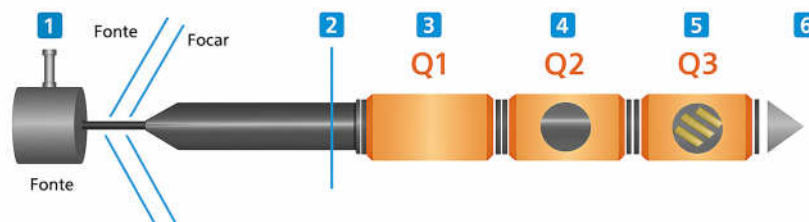
Figura 2: Representação esquemática de um quadrupolo utilizado em espectrômetros de massas. A estrutura é composta por quatro barras metálicas paralelas que geram campos elétricos oscilantes, permitindo a seleção de íons conforme sua razão massa/carga (m/z).



Adaptado de SOARES, 2011.

Figura 3: Esquema operacional de um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (QqQ). Onde: 1 - fonte de ionização; 2 - Q0 ou focalizador de íons; 3 - Quadrupolo Q1; 4 - Célula de colisão; 5 - Quadrupolo Q3; 6 - Detector de íons.

Esquema de um triplo quadrupolo



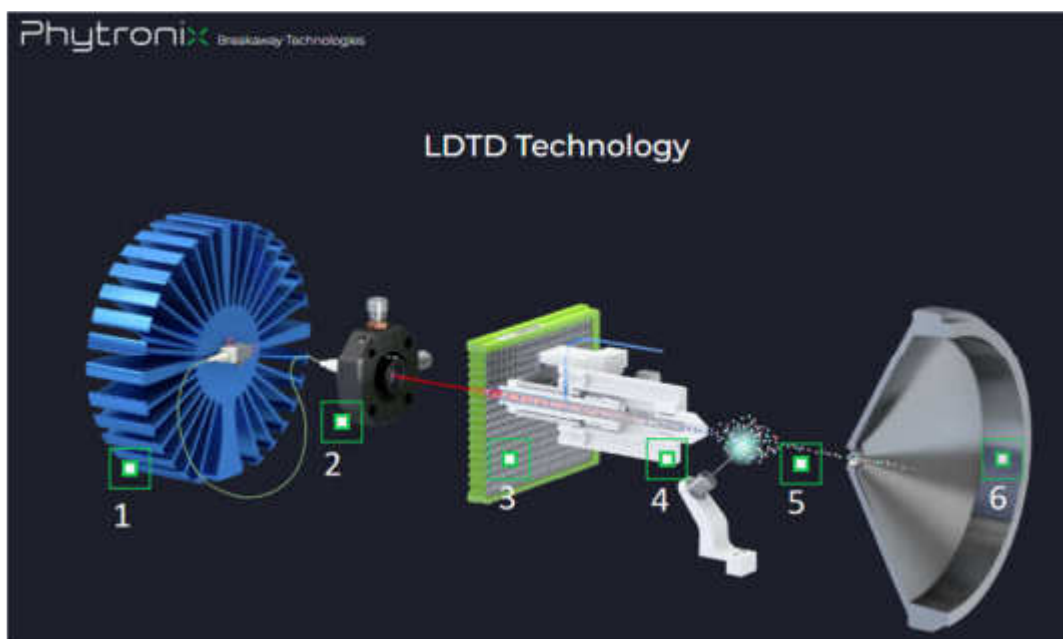
Adaptado de SOARES, 2011.

A técnica LDTD foi desenvolvida e introduzida por uma equipe de cientistas liderada por Pierre Picard, da empresa Phytronix Technologies. PICARD et al., 2008 solicitaram a patente do equipamento pioneiro descrevendo a técnica LDTD em 2005 a qual foi publicada em 2008. Algumas publicações com uso da técnica começaram a surgir a partir de 2006. Em 2007 WU e colaboradores, destacaram o uso de LDTD acoplado a espectrometria com uso de APCI para análise de múltiplos compostos na inibição do citocromo P450. Nesse estudo, os pesquisadores apresentaram os princípios e a aplicação da técnica LDTD para a análise de amostra contendo compostos orgânicos. Desde então, a técnica tem sido objeto de diversas pesquisas e desenvolvimentos, contribuindo para avanços na análise direta de compostos voláteis e sua aplicação em diversas áreas científicas e industriais.

LDTD é particularmente útil para análise direta de amostras sólidas, como tecidos, comprimidos, manchas em papel, entre outros. Ela permite a liberação rápida e seletiva de compostos da amostra, sem a necessidade de preparação complexa ou extração prévia. Além disso, a LDTD oferece alta velocidade de análise e baixo consumo de reagentes. A técnica consiste em volatilizar os compostos da amostra, eles são ionizados e direcionados para o espectrômetro de massas, onde são separados de acordo com suas massas e cargas. Essa separação permite a identificação dos compostos presentes na amostra com base em seus espectros de massa característicos. Podendo ser usada em análises de águas residuais. (BADJAGBO; SAUVÉ, 2012; BYNUM; MOORE; GRABENAUER, 2014)

Segura, Perrier e Sauvé (2022) destacam a rápida transferência térmica, aliada a ausência de fase móvel e eliminação da coluna cromatográfica reduzem o tempo total de análise de cada amostra para alguns segundos ao invés de minutos, o que representa uma vantagem substancial em contextos de alto rendimento analítico, e torna LDTD-MS/MS uma técnica promissora para aplicação em estudos de bioequivalência e biodisponibilidade, por ser uma técnica ainda em ascensão.

Figura 4: Funcionamento da tecnologia Laser Diode Thermal Desorption (LDTD), utilizado em espectrometria de massas triplo quadrupolo, onde: 1- Matriz de laser de diodo acoplada a um dissipador de calor; 2- Colimador de fibra óptica; 3 - Placa LazWell; 4 - Túnel pneumático condutor de amostra; 5 - Moléculas dessorvidas são ionizadas por uma agulha corona; 6 - Alta eficiência de protonação pela ausência de solvente e entrada no espectrômetro de massas.



Adaptado de: PHYTRONIX, 2018.

Diante do abordado até o momento, a relevância da aplicação do LDTD-MS/MS é evidente. A técnica reduz a dependência da cromatografia líquida e evita etapas

tradicionais de preparo e separação de amostras, que normalmente consomem grande parte do tempo de uma rotina analítica. Com isso, torna possível realizar análises muito mais rápidas sem perda significativa de seletividade ou desempenho quantitativo. Em estudos de bioequivalência, nos quais o número de amostras é elevado e os intervalos de detecção costumam ser bastante restritos, essa redução no tempo analítico representa um ganho real. Nesse contexto, o presente trabalho se propõe a avaliar essa abordagem, utilizando a dessorção térmica por laser de diodo acoplada ao triplo quadrupolo como uma alternativa prática e eficiente para a quantificação de lamotrigina em plasma humano.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método por LDTD-MS/MS e aplicá-lo em um estudo de bioequivalência de lamotrigina.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Desenvolver método de extração e preparo de amostra biológica para ser utilizado em uma análise por LDTD-MS/MS.

b) Desenvolver método de detecção e quantificação de lamotrigina através da técnica de LDTD-MS/MS.

c) Validar de acordo com a RDC N°27 de 2012 o método desenvolvido em LDTD-MS/MS.

d) Aplicar o método validado na análise de amostra em um estudo de bioequivalência de lamotrigina.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Substâncias e reagentes

- Acetato de amônio – P.A.
- Acetonitrila – Grau HPLC.
- Ácido fórmico – 88%.
- Metanol – Grau HPLC.
- Éter metil terc-butil (MTBE) – Grau HPLC.
- Albumina sérica bovina (BSA)
- Fosfato de potássio monobásico – Grau HPLC

Padrões farmacopéicos:

- Lamotrigina;
- Carbamazepina;
- Cafeína;
- Ondansetrona;
- 4-Metilaminoantipirina;
- Paracetamol;
- Cotinina;
- Butil brometo de escopolamina.

4.1.2 Equipamentos e utensílios diversos

- Agitadores de eppendorf Ika;
- Balança analítica Mettler Toledo;
- Centrífuga para tubos tipo eppendorf;
- Fonte Phytronix LDTD Luxon ion source®;
- Espectrômetro de massas SCIEX 6500+;
- Pipetadores Handy steps;

- Micropipetas Gilson;
- Placas Lazwell;

4.2 MÉTODOS

A condução dos ensaios assim como o desenvolvimento e aplicação do método foi totalmente realizada no Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF) localizado na cidade de Goiânia, no estado de Goiás, Brasil, em parceria com o laboratório NEPET sobre a orientação do professor Dr. Luiz Carlos da Cunha.

4.2.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES EM SOLVENTE E EM PLASMA, CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS.

Para preparo e utilização neste trabalho, inicialmente pesou-se 2,00 mg do padrão de lamotrigina para balão volumétrico de 10 mL, solubilizou-se com acetonitrila e avolumou-se com acetonitrila:água (1:1) (v/v), originando a solução estoque de concentração 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Com micropipeta pipetou-se 50 μL da solução estoque para balão volumétrico de 100 mL e avolumou-se com metanol:água (1:1) (v/v), originando a solução para infusão em espectrômetro de massas (100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). De forma análoga pesou-se carbamazepina e diluiu-se para originar a mesma solução para infusão. Estas soluções foram utilizadas em modo positivo de infusão direta no espectrômetro de massas SCIEX 6500+ para geração de íons precursores em Q1 e íons fragmento em Q3, para construção do método MRM a ser utilizado.

O espectrômetro de massas procura e detecta as razões massa/carga (m/Z) das substâncias de interesse no primeiro quadrupolo, otimiza suas energias internas de maneira a favorecer a entrada e detecção destes íons em Q1. Após isso ele fragmenta as moléculas de interesse e seleciona os fragmentos mais intensos e estáveis provenientes de cada íon de interesse, gerando uma m/Z em Q3 denominadas íons fragmentos, formando assim um par iônico único e específico em Q1 e Q3 que serão utilizados para detectar e quantificar as substâncias de interesse.

Foram preparadas amostras de lamotrigina em solução, utilizando acetonitrila:água (1:1) (v/v), como solvente de diluição, nas seguintes concentrações: 100; 300; 1000; 2500; 5000; 6000; e 10000 ng.mL⁻¹. Para preparo das curvas de calibração em amostras biológicas, 10 µL de cada solução foram adicionados em 50 µL de plasma humano branco criando a linearidade utilizada de 20 a 2000 ng.mL⁻¹. Controles de qualidade foram preparados em plasma nas concentrações: 60 ng.mL⁻¹ para CQB, 1000 ng.mL⁻¹ para CQM, 1600 ng.mL⁻¹ para CQA e 20 ng.mL⁻¹ para o LIQ. As soluções foram armazenadas em refrigerador +2 a +8 °C, já os controles de qualidade em plasma foram armazenados em freezer -70 °C.

O objetivo destes controles de qualidade sempre foram verificar se a faixa de linearidade proposta era atingida e mantinha-se com precisão e exatidão ao longo das análises.

Uma solução de carbamazepina a 2000 ng.mL⁻¹ foi utilizada como padrão interno possibilitando que possíveis variações durante a preparação e análise das amostras (como perdas na extração, variações de análise ou detecção), possam ser corrigidas, e garantindo maior robustez aos resultados.

A fonte LD TD foi utilizada em rampa de laser com intensidade variando de 0 a 70% em um gradiente crescente. Para avaliação de dopantes nas placas LazWell foram utilizadas duas soluções distintas, a ideia era apenas contaminar poços das placas com 10 µL do dopante e secar as placas para posterior utilização com o método de extração a ser testado. A presença destas substâncias secas previamente na placa visa favorecer o perfil e facilitar a dessorção térmica dos compostos de análise. Foram utilizados albumina de soro bovino (BSA) na concentração de 100 µg.mL⁻¹ e também fosfato de potássio 1mM diluído em água ultra pura.

4.2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

4.2.2.1 Extração por precipitação de proteínas

Foram testados dois métodos de extração, o método de precipitação de proteínas, onde é adicionado um agente precipitante, neste caso foram utilizados em

teste ao longo do desenvolvimento tanto acetonitrila quanto metanol como agente precipitante.

Ao precipitar as proteínas da matriz biológica arrastando os fragmentos maiores da solução para a parte de baixo da mistura, quando o analito que se quer analisar consegue ficar disponível na parte aquosa, as amostras são centrifugadas e o sobrenadante então é transferido para utilização.

Neste caso a extração seguiu-se da seguinte forma: 50 μL do plasma que se queria extrair lamotrigina era adicionado em um eppendorf com capacidade de 1,5 mL, em seguida era adicionado 10 μL da solução de padrão interno e 500 μL do agente precipitante. As amostras eram agitadas em plataformas agitadores por 2 minutos a 1500 rpm. Após agitação as amostras eram centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos e 10 μL do sobrenadante eram transferidos para placa LazWell, secos com fluxo de nitrogênio. Após secagem completa as amostras eram submetidas a análise no sistema LDTD-MS/MS.

4.2.2.2 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido selecionada para testes e escolhida para aplicação no método foi simples e consistiu da aplicação do solvente orgânico éter metil terc-butílico (MTBE) diretamente na amostra contendo lamotrigina que se queria extrair, a agitação proporcionava o contato direto entre as moléculas presentes no plasma e o solvente de extração, conforme a afinidade do analito era maior com o solvente orgânico que com a parte aquosa do plasma, havia uma migração natural do ativo saindo do plasma e povoando o solvente orgânico, o solvente então era separado por centrifugação e transferido para um tubo limpo, onde era seco.

No caso do método em questão a extração seguiu as etapas: 50 μL do plasma contendo lamotrigina era adicionado em um eppendorf com capacidade de 1,5 mL, em seguida adicionava-se 10 μL da solução de padrão interno e 1250 μL do MTBE. As amostras eram agitadas em plataformas agitadores por 2 minutos a 1500 rpm. Após agitação as amostras eram centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos e 180 μL do sobrenadante eram transferidos para tubos limpos, em seguida eram secos a 40 °C e

fluxo de ar sintético. Após esta etapa as amostras eram ressuspensas com 100 µL de metanol 50% e agitadas por 8 segundos, e 2,5 µL eram transferidos para placa LazWell, secos com fluxo de nitrogênio. Após secagem completa as amostras eram submetidas a análise no sistema LDTD-MS/MS.

Portanto, neste trabalho sempre que amostras foram extraídas ao longo da validação, a extração utilizada foi líquido-líquido com MTBE conforme descrito nesta sessão.

4.2.3 DESCRIÇÃO DOS TESTES DE VALIDAÇÃO

4.2.3.1 Seletividade

Para realização do ensaio de seletividade, foram utilizadas seis fontes distintas de plasma branco, sendo quatro delas plasmas normais, uma fonte com plasma hemolisado e uma fonte com plasma lipêmico. Todas estas fontes foram extraídas conforme o método de extração descrito. Além disso, foram preparadas para cada uma dessas seis fontes amostras contaminadas com os seguintes fármacos concomitantes em suas respectivas concentrações: cafeína (1000 ng.mL⁻¹), 4-metilamino antipirina (8000 ng.mL⁻¹), ondansetrona (1500 ng.mL⁻¹), paracetamol (20000 ng.mL⁻¹), butilbrometo de escopolamina (2 ng.mL⁻¹) e cotinina (1500 ng.mL⁻¹).

Além destas amostras foram extraídas uma amostra de lamotrigina na concentração do LIQ (20 ng.mL⁻¹) e uma amostra de padrão interno extraído. Estas amostras serviram como referência para avaliação dos resultados do ensaio, onde nenhuma amostra avaliada com ou sem fármacos concomitantes apresenta picos interferentes de dessorção térmica acima de 20% da área obtida para a amostra de LIQ e nenhuma amostra pode apresentar pico interferente de dessorção térmica acima de 5% em relação a área obtida pela amostra de padrão interno extraída.

4.2.3.2 Efeito matriz

Para realização do ensaio de determinação do efeito matriz, foram utilizadas oito fontes distintas de plasma branco, sendo quatro delas plasmas normais, duas fontes com plasma hemolisados e duas fontes com plasma lipêmicos. O ensaio

utilizou concentrações de CQB e CQA para todas as fontes de plasma, além disso assim como na seletividade foram utilizadas as fontes contaminadas com fármacos concomitantes nas concentrações mencionadas no ensaio de seletividade, de tal forma que foram preparadas e extraídas 16 amostras que foram dopadas com concentração de CQB (60 ng.mL^{-1}) e 16 amostras que foram dopadas com concentração de CQA (1600 ng.mL^{-1}). Estas amostras foram comparadas com três amostras, preparadas sem plasma utilizando acetonitrila 50% como solvente, na concentração de CQB e três amostras na concentração de CQA. Foram calculados os fatores de matriz normalizada (FNM) conforme RDC N° 27 de 2012 da ANVISA, não deveriam ser maior que 15% para ambas as concentrações avaliadas.

4.2.3.3 Efeito residual

Para avaliação do efeito residual foram extraídos uma amostra de plasma branco, uma amostra de LIQ e uma amostra de LSQ. Normalmente o teste é realizado em sistemas LC-MS/MS analisando-se a amostra branco, seguida do LIQ e LSQ. Logo após a análise destas três amostras é realizada a repetição do branco já analisado anteriormente em duplicata. O não aparecimento de picos interferentes acima de 20% do valor obtido para o LIQ e 5% do valor obtido de padrão interno na amostra LIQ o teste é considerado aprovado.

Ao se utilizar o método de LDTD-MS/MS uma vez que a amostra é analisada, com a dessorção térmica no poço de análise restam naquele local apenas resíduos que não foram dessorvidos na análise inicial. Para esse ensaio, realizou-se a extração de amostra branco, LIQ e LSQ. Após a extração e ressuspensão das amostras foram aliqüotadas no poço 1 o branco, no 2 o LIQ, no 3 o LSQ e nos poços 4 e 5 foram aliqüotadas o mesmo branco que havia sido extraído e colocado no poço 1, já que são ressuspensos $100 \mu\text{L}$ de amostra e somente utilizados $2,5 \mu\text{L}$ deste sobrenadante era utilizado em cada poço da placa LazWell. Dessa forma, ao analisar os poços 4 e 5 estavam sendo analisados novamente a amostra branco contida no poço 1, e o resultado do poço 4 e 5 deveria cumprir o mesmo critério do branco, de tal forma que demonstrasse que não havia arraste de concentrações maiores vindas de poços de análise anteriores.

4.2.3.4 Linearidade, Precisão e Exatidão

No presente trabalho curva de calibração sempre era composta por 18 amostras sendo elas: 2 amostras branco extraídas, 2 amostras branco contaminadas com padrão interno, 2 pontos de cada concentração da curva de calibração em plasma e estando estes dispostos em 7 níveis distintos de concentração sendo eles: 20 ng.ml⁻¹, 60 ng.ml⁻¹, 200 ng.ml⁻¹, 500 ng.ml⁻¹, 1000 ng.ml⁻¹, 1200 ng.ml⁻¹ e 2000 ng.ml⁻¹. Dessa forma, a faixa de calibração adotada neste estudo está em concordância com os valores reportados na literatura.

Para verificação da linearidade, precisão e exatidão foram extraídas uma curva de calibração e seis amostras de controles de qualidade em cada nível de avaliação, sendo estes: CQA (1600 ng.ml⁻¹), CQM (1000 ng.ml⁻¹), CQB (60 ng.ml⁻¹) e LIQ (20 ng.ml⁻¹). A linearidade foi demonstrada através da avaliação do coeficiente de correlação linear mínimo de 0,99. Cada curva precisa cumprir no mínimo 75% de níveis com desvio máximo de 15% em relação a seus valores nominais, com exceção do LIQ onde foram aceitos desvios de até 20%. Cada conjunto de controle de qualidade era avaliado frente a seu valor nominal, devendo o CV% de cada nível ser inferior ou igual a 15% e 20% para o LIQ.

Este teste foi repetido três vezes em dias distintos, e cada conjunto de controle foi avaliado em cada corrida e somando-se todas as corridas, gerando um conjunto de 18 controles para cada nível avaliado, permitindo avaliar a precisão e exatidão intra e inter ensaios.

4.2.3.5 Estabilidade de curta duração (ECD)

Para avaliação da estabilidade de curta duração 06 amostras de CQA e 06 amostras de CQB foram retiradas do freezer -70°C, e deixadas sobre bancada a temperatura ambiente e permaneceram por um período de aproximadamente 6 horas e 34 minutos. Após este período as amostras foram submetidas ao processo de extração juntamente com um conjunto de curva de calibração. Como critério para avaliação da estabilidade, a média do conjunto de amostras de controle de qualidade não pode apresentar variações acima de 15% em relação a seus valores nominais.

4.2.3.6 Estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento (ECCD)

Para realização do ensaio de ECCD, foram utilizadas 24 amostras de CQA e 24 amostras de CQB em plasma, que foram mantidas armazenadas em freezer -70°C. A cada período de no mínimo 12 horas de congelamento as amostras eram retiradas do freezer, descongeladas e mantidas em bancada ao menos por 30 minutos, após isso as amostras eram novamente congeladas. Este processo representa um ciclo de ECCD. Para este trabalho adotou-se como padrão a realização de 4 ciclos de ECCD. Ao final dos 4 ciclos, 6 amostras de CQA e 6 amostras de CQB foram retiradas do freezer, descongeladas e submetidas ao processo de extração junto com uma curva de calibração recém preparada. Como critério para avaliação da estabilidade, a média do conjunto de amostras de controle de qualidade não pode apresentar variações acima de 15% em relação a seus valores nominais.

4.2.3.7 Estabilidade Pós-Processamento (EPP)

Para realização do ensaio de EPP, normalmente o teste é realizado em sistemas LC-MS/MS analisando-se amostras CQB e CQA e após o período de estabilidade que se quer avaliar as amostras são novamente injetadas e analisadas junto a uma curva recém preparada. Como mencionado no ensaio de efeito residual, uma vez analisada não é possível repetir a análise da mesma amostra no poço já analisado da placa LazWell. Sendo assim, para realização deste ensaio optou-se por analisar uma curva de calibração e 6 amostras de CQA e 6 amostras de CQB, estas mesmas amostras de controles extraídas foram alíquotadas em outros poços vazios e secos. Após o período de 1 hora e 55 minutos armazenadas na fonte LDTD, nova curva foi extraída e as amostras de CQA e de CQB que já estavam na placa foram avaliadas junto a curva recente. Como critério para avaliação da estabilidade, a média do conjunto de amostras de controle de qualidade não pode apresentar variações acima de 15% em relação a seus valores nominais.

4.2.3.8 Estabilidade de Longa duração (ELD)

Para avaliação da estabilidade de longa duração, amostras de CQA e CQB em plasma humano foram armazenadas em freezer -70°C por um período de 75 dias. Após este período de estabilidade 6 controles CQA e 6 controles CQB foram retirados do freezer e descongelados em temperatura ambiente, uma curva recente foi preparada e extraídas juntamente com estas amostras. Como critério para avaliação da estabilidade, a média do conjunto de amostras de controle de qualidade não pode apresentar variações acima de 15% em relação a seus valores nominais.

4.2.4 APLICAÇÃO CLÍNICA DO MÉTODO EM UM ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA

Após validação do método bioanalítico conforme RDC N°27 de 2012, este foi aplicado em um estudo clínico monocêntrico, aberto, randomizado e cruzado com dois tratamentos, duas sequências e dois períodos. O ensaio foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisas do Instituto de Ciências Farmacêuticas, sob o número de protocolo 5.610.806. Participaram do estudo 36 participantes de pesquisa saudáveis, de ambos os sexos que foram submetidos a duas formulações orais de lamotrigina comprimidos de 100 mg, referência e teste em condições de jejum com coletas truncadas em 96 horas.

Os tempos de coleta foram: pré-dose ou 0,0h; 0,25h; 0,50h; 0,75h; 1,00h; 1,25h; 1,50h; 2,00h; 2,50h; 3,00h; 3,50h; 4,00h; 5,00h; 6,00h; 8,00h; 12,00h; 24,00h; 48,00h; 72,00h e 96,00h.

Após a obtenção das concentrações plasmáticas foram calculados os parâmetros farmacocinéticos utilizando o software Phoenix WinNonlin® v.6.4.0.768.

- C_{max} (concentração plasmática máxima observada): obtida diretamente a partir dos dados experimentais.
- T_{max} (tempo necessário para atingir C_{max}): o tempo onde o C_{max} é observado.
- AUC_{0-96h} (área sob a curva de concentração plasmática de zero até 96 horas): calculada pelo método dos trapezóides, conforme equação:

$$AUC = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(C_i + C_{i+1})}{2} \cdot (t_{i+1} - t_i)$$

C_i : concentração plasmática no tempo t_i .

C_{i+1} : concentração plasmática no tempo t_{i+1} .

t_i : tempo da coleta i .

t_{i+1} : tempo da coleta subsequente.

n : número total de pontos de coleta utilizados no cálculo.

Σ : somatório das áreas calculadas entre cada par de pontos consecutivos.

- $t_{1/2}$ (meia-vida de eliminação): calculada pela equação:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K_e}$$

$t_{1/2}$: meia-vida de eliminação do fármaco.

K_e : constante de eliminação obtida pela regressão log-linear da fase terminal.

- Cl/F (clearance aparente após administração oral):

$$Cl/F = \frac{Dose}{AUC_{0-96}}$$

Dose: quantidade de fármaco administrada ao voluntário.

AUC_{0-96} : área sob a curva plasmática do tempo zero até 96 horas.

- V_z/F (volume de distribuição aparente após administração oral):

$$V_z/F = \frac{Cl/F}{K_e}$$

Cl/F : depuração aparente.

K_e : constante de eliminação da fase terminal.

A literatura mostra que a área de bioanálise evoluiu de maneira contínua, acompanhando as demandas crescentes dos estudos de bioequivalência. Essa transição começou lá atrás, quando a ionização por eletrospray se firmou como uma alternativa realmente eficaz para análises quantitativas, abrindo espaço para métodos mais sensíveis e seletivos. Com o tempo, novas abordagens foram surgindo e ampliando essas possibilidades, especialmente no que diz respeito à redução do tempo analítico e à eliminação de etapas consideradas críticas no preparo das amostras. (FENN et al., 1989)

Nos últimos anos, além dessa evolução natural das fontes de ionização, algumas técnicas que dispensam a etapa cromatográfica passaram a receber maior atenção. Entre elas, o LDTD-MS/MS se destacou por combinar rapidez e desempenho analítico, o que tem sido particularmente útil em matrizes complexas. Mesmo com esses avanços, o triplo quadrupolo permanece como o núcleo da quantificação bioanalítica, especialmente pela capacidade de manter seletividade, boa faixa dinâmica e estabilidade nas transições monitoradas em MRM. Esses elementos reforçam por que esse tipo de analisador continua essencial em estudos deste tipo. (PICARD et al., 2008; SEGURA; PERRIER; SAUVÉ, 2022; VAN DONGEN; NIESSEN, 2012; CHAMBERS et al., 2007)

Com base nesse conjunto de avanços, a aplicação clínica do método desenvolvido neste trabalho se insere de forma coerente no cenário atual da bioanálise. A validação e cumprimento de guias e resoluções de agências reguladoras oficiais garantem qualidade e segurança para utilização de métodos “alternativos” possíveis de serem aplicados em estudos de bioequivalência, sem abrir mão da agilidade necessária para grandes volumes de amostras. Aliado a isso, maior sustentabilidade é o que se busca de maneira global em processos e aplicações produtivas e reforçam que quando corretamente avaliados, podem contribuir para rotinas laboratoriais mais rápidas, sem prejuízo da confiabilidade dos parâmetros farmacocinéticos (CHAMBERS et al., 2007; MATUSZEWSKI et al., 2003; EMA, 2010; FDA, 2018).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo em anexo - High-Throughput Laser Diode Thermal Desorption-Tandem Mass Spectrometry Method for Rapid Determination of Lamotrigine in Human Plasma.

Autores: Glauco César F. F. Soares, Danillo F. M. C. Veloso, Iram M. Mundim, Leonardo S. Teixeira, Maria Carolina Almeida e Luiz Carlos da Cunha.

Publicado este ano no: Journal of the Brazilian Chemical Society (JBACS) .

A epilepsia é uma condição que ainda desafia a saúde pública mundial. O impacto não fica restrito apenas ao indivíduo: ele se estende para a família, para a rotina social e até para o sistema de saúde, que arca com altos custos. Entre os medicamentos disponíveis, a lamotrigina acabou se consolidando como uma das principais escolhas da segunda geração de anticonvulsivantes. Isso acontece pelo conjunto de características favoráveis, bom perfil farmacocinético, tolerabilidade clínica e eficácia comprovada tanto em crises parciais quanto generalizadas. Mesmo assim, quando falamos em monitorização terapêutica ou em estudos de bioequivalência, fica claro que são necessários métodos analíticos sólidos, seletivos e rápidos, capazes de lidar bem com a complexidade das matrizes biológicas.

Neste estudo, conseguimos desenvolver e validar um método baseado em Dessorção Térmica de Laser de Diodo acoplado à espectrometria de massas (LDTD-MS/MS) para quantificar lamotrigina em plasma humano. O desempenho foi consistente: seletividade, linearidade, exatidão, precisão, estabilidade e ausência relevante de efeito matriz foram todos atendidos. Isso garante conformidade com a RDC Nº 27 de 2012 (ANVISA) e também com guias internacionais de validação bioanalítica (FDA, EMA, ICH).

Durante o desenvolvimento, a extração líquido-líquido usando MTBE mostrou-se mais vantajosa do que a precipitação de proteínas. Essa escolha melhorou a remoção de interferentes endógenos e, com isso, aumentou a seletividade do método. Outro aspecto que merece destaque é o baixo volume de plasma necessário, apenas 50 µL, o que representa ganho em termos de rendimento e sustentabilidade. Quando aplicado a um estudo comparativo de farmacocinética entre formulações de referência e teste de lamotrigina, o método se mostrou não apenas confiável, mas também rápido: cada amostra foi analisada em cerca de 10 segundos, tempo que o coloca entre os protocolos mais velozes já descritos para esse fármaco no mundo sendo entre 30 e 90 vezes mais rápido que os métodos de LC-MS/MS da literatura.

O teste de efeito matriz aprovado confirma que amostras secas submetidas a dessorção térmica por laser de diodo com ajuste de rampa adequada de laser permitem a ionização do analito sem grandes interferências e consolidam que o

desenvolvimento adequado desta técnica pode contornar os efeitos de matriz mais comuns em amostras líquidas.

Esse trabalho mostra como técnicas alternativas à cromatografia líquida podem ter espaço na bioanálise. O LDTD-MS/MS é especialmente interessante em estudos de bioequivalência, que envolvem muitas amostras em prazos curtos. Claro que há limitações, a falta de separação cromatográfica e a dificuldade com analitos sensíveis ao calor ainda são barreiras, sem falar em fármacos dependentes de ionização com adutos como a ivermectina por exemplo, mas mesmo assim, os dados obtidos reforçam a viabilidade dessa estratégia em contextos regulatórios.

No final, esta dissertação contribui para consolidar a técnica de LDTD-MS/MS como uma ferramenta promissora na bioanálise farmacêutica, especialmente em cenários que exigem alta produtividade analítica. A partir do método desenvolvido, abrem-se possibilidades concretas para a avaliação de outros fármacos, diferentes matrizes biológicas e aplicações clínicas que podem se beneficiar de análises mais rápidas e seletivas. A integração entre inovação tecnológica e rigor científico demonstrou que é viável adotar estratégias analíticas mais ágeis, sustentáveis e menos dependentes de etapas cromatográficas, tanto em laboratórios de pesquisa quanto em contextos clínicos e regulatórios. Dessa forma, os avanços apresentados neste trabalho tendem a impactar positivamente o monitoramento terapêutico e a execução de estudos de bioequivalência, oferecendo perspectivas reais de melhoria para pacientes com epilepsia e outras condições crônicas que demandam métodos confiáveis, seguros e acessíveis.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bishop M, Allen CA. The impact of epilepsy on quality of life: a qualitative analysis. *Epilepsy Behav.* 2003;4(3):226-33.
2. Chambers E, Woodcock W, Lu Z, Pierce A. Matrix effects in bioanalytical LC-MS/MS: sources, implications and mitigation. *J Chromatogr B.* 2007;852(1-2):22-34.
3. ChemSpider. Lamotrigine — Chemical Structure. ChemSpider, ID 3741. Royal Society of Chemistry. Available from: <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3741.html>. Accessed 2025 Jul 15.
4. Dillen L, Cools W, Vereyken L, Lorreyne W, Huybrechts T, De Vries R, et al. Comparison of triple quadrupole and high-resolution TOF-MS for quantification of peptides. *Bioanalysis.* 2012;4(5):565-79. doi:10.4155/bio.12.3.
5. European Medicines Agency (EMA). Guideline on the investigation of bioequivalence. London: EMA; 2010. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf. Accessed 2025 Jul 28.
6. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989;246(4926):64-71. doi:10.1126/science.2675315.
7. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, et al. ILAE official report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia.* 2014;55(4):475-82.
8. French JA, Fee DB. New generation antiepileptic drugs: what do they offer in terms of improved tolerability and safety? *Epilepsia.* 2011;52 Suppl 1:44-52.
9. GlaxoSmithKline Brasil Ltda. Lamictal® (lamotrigina) – Bula do profissional de saúde. Rio de Janeiro; 2025. Available from: https://www.gsksource.com/pharma/content/dam/GlaxoSmithKline/US/en/Prescribing_Information/Lamictal/pdf/LAMICTAL-PI-MG.PDF. Accessed 2025 Aug 15.
10. Glauser T, Ben-Menachem E, Bourgeois B, Coté M, Craig S, Genton P, et al. Updated ILAE evidence review of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia.* 2013;54(3):551-63.

11. Guberman A, Katz A, Couture D, St. Louis P, Dion F, Harden C, et al. Lamotrigine-associated rash: Risk/benefit considerations in adults and children. *Epilepsia*. 1999;40(7):985-91.
12. Hughes J. Making isotopes matter: Francis Aston and the mass-spectrograph. *Hist Philos Sci*. 2009;1(1):1-18.
13. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). M10: Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis. Geneva: ICH; 2022.
14. Kanner AM, Baldwin R, Mikati MA, Munhoz RP, De Toledo JC, Lewis A, et al. Depression and epilepsy: A new perspective on two closely related disorders. *Epilepsy Behav*. 2018;78:123-30.
15. Kim HJ, Lee SA, Chung CY, Choi HJ, Park KY, Hwang KY, et al. Antiepileptic Drug Selection According to Seizure Type in Adult Patients with Epilepsy. *J Clin Neurol*. 2020;16(3):393-400.
16. Maher S, Jjunju FP, Taylor S. Colloquium: 100 years of mass spectrometry: Perspectives and future trends. *Rev Mod Phys*. 2015;87(1):113-30. doi:10.1103/RevModPhys.87.113.
17. Mastan S, Latha TB, Ajay S. The basic regulatory considerations and prospects for conducting bioavailability/bioequivalence (BA/BE) studies – an overview. *Comp Eff Res*. 2011;1:1-25. doi:10.2147/CER.S15861.
18. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram concentrations. *Anal Chem*. 1998;70(5):882-9.
19. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS. *Anal Chem*. 2003;75(13):3019-30. doi:10.1021/ac020361s.
20. Nasiri A, Ranjbar A, Nourifar M, Khodadadi A, Mohammadi B, Ghorbani R. Matrix effect in bioanalytical methods: A critical review. *J Pharm Biomed Anal*. 2021;206:114360. doi:10.1016/j.jpba.2021.114360.

21. Peterle EC, Leal DAG, Medani MEB, Silva JMd, Meneghin MCLAL, Assad SS. Epilepsia na prática clínica: avaliação inicial, classificação e tratamento de manutenção. *J Med Biosci Res.* 2025;2(4):231-44.
22. Phytronix. LDTD Technology – Breakaway Technologies. YouTube. 2018. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=KuSVNptfVgY>. Accessed 2025 Jul 11.
23. Rho JM, White HS. Brief history of anti-seizure drug development. *Epilepsia Open.* 2018;3 Suppl 2:114-9. doi:10.1002/epi4.12268.
24. Shorvon SD. The causes of epilepsy: Changing concepts of etiology of epilepsy over the past 150 years. *Epilepsia.* 2011;52(6):1033-44.
25. Soares GCFF. Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para detecção e quantificação de pantoprazol em plasma humano utilizando técnica de CLAE-MS/MS [TCC]. Anápolis (GO): Universidade Estadual de Goiás; 2011.
26. Van Dongen WD, Niessen WMA. LC–MS systems for quantitative bioanalysis. *Bioanalysis.* 2012;4(19):2391-9. doi:10.4155/bio.12.221.
27. Wahab A. Difficulties in treatment and management of epilepsy and challenges in new drug development. *Pharmaceuticals (Basel).* 2010;3(7):2090-110.
28. World Health Organization (WHO). Epilepsy: A public health imperative. Geneva: WHO; 2019. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/epilepsy-a-public-health-imperative>. Accessed 2025 Aug 10.
29. Zuberi SM, Symonds JD. Update on diagnosis and management of childhood epilepsies. *J Pediatr (Rio J).* 2015;91(6 Suppl 1):S61-70.
30. Picard P, Letarte S, Rochon J, Paquin RE. In: Laser Diode Thermal Desorption-Mass Spectrometry (LDTD-MS) [Internet]. 2023 [cited 2024 May 14]. Available from: <https://doi.org/10.1002/9781119678496.ch11>
31. Joh S, Na HK, Son JG, Lee AY, Ahn CH, Ji DJ, et al. Quantitative Analysis of Immunosuppressive Drugs Using Tungsten Disulfide Nanosheet-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *ACS Nano* [Internet]. 2021 Jun 22;15(6):10141–52. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c02016>

32. Wang H, Zhao X, Huang Y, Liao J, Liu Y, Pan Y. Rapid quality control of medicine and food dual purpose plant polysaccharides by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analyst* [Internet]. 2020;145(6):2168–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C9AN02440A>
33. Andersen WC, VanSickle M, Storey J, Sheldon V, Lohne J, Turnipseed SB, et al. Fast analysis of caffeinated beverages using laser diode thermal desorption mass spectrometry (LDTD-MS/MS). *Food Addit Contam Part A* [Internet]. 2019 Nov 2;36(11):1616–25. Available from: <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1658904>
34. Bořík A, Nováková P, Stroski KM. Rapid target screening and quantitative analysis of various environmental pollutants. *Rapid Commun Mass Spectrom* [Internet]. 2023 Apr 13 [cited 2024 May 14];n/a(n/a):e9517. Available from: <https://doi.org/10.1002/rcm.9517>
35. da Silva Celedonio Thaisa Alves, Lustosa Alves Isadora, Kogawa Carolina Ana. Moxifloxacin: Physical-chemical and Microbiological Analytical Methods in the Context of Green Analytical Chemistry. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2023;29(15):1166–72. Available from: <http://www.eurekaselect.com/article/131794>
36. Vervoort N, Goossens K, Baeten M, Chen Q. Recent advances in analytical techniques for high throughput experimentation. *Anal Sci Adv* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2024 May 13];2(3–4):109–27. Available from: <https://doi.org/10.1002/ansa.202000155>
37. Cantor SL, Gupta A, Khan MA. Analytical Methods for the Evaluation of Melamine Contamination. *J Pharm Sci* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2024 May 13];103(2):539–44. Available from: <https://doi.org/10.1002/jps.23812>
38. Kaya SI, Cetinkaya A, Ozkan SA. Green analytical chemistry approaches on environmental analysis. *Trends Environ Anal Chem* [Internet]. 2022 Mar 1;33:e00157. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214158822000046>
39. Sinzervinch Aline, Torres Maria Sapateiro Ieda, Kogawa Carolina Ana. Tools to Evaluate the Eco-efficiency of Analytical Methods in the Context of Green and White

Analytical Chemistry: A Review. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2023;29(31):2442–9. Available from: <http://www.eurekaselect.com/article/135549>

40. Branstetter L, Chatterjee C, Higgins MJ. Generic competition and the incentives for early-stage pharmaceutical innovation. *Res Policy* [Internet]. 2022 Dec 1;51(10):104595. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048733322001184>

41. Zhou S, Li R, Chen Z, Ren R, Wang X, Dai Q, et al. LC–MS/MS quantification of levetiracetam, lamotrigine and 10-hydroxycarbazepine in TDM of epileptic patients. *Biomed Chromatogr* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2024 May 13];36(8):e5393. Available from: <https://doi.org/10.1002/bmc.5393>

42. Milosheska D, Roškar R, Vovk T, Lorber B, Grabnar I, Trontelj J. An LC-MS/MS Method for Quantification of Lamotrigine and Its Main Metabolite in Dried Blood Spots. *Pharmaceuticals*. 2024;17(4).

43. Shi X, Zhang D, Zhao Z, Mei S. UHPLC-MS/MS for plasma lamotrigine analysis and comparison with a homogenous enzyme immunoassay. *Bioanalysis* [Internet]. 2024 Feb 1 [cited 2024 May 13];16(4):233–43. Available from: <https://doi.org/10.4155/bio-2023-0183>

44. Wong JM, Jones JW, Jiang W, Polli JE, Kane MA. Quantification of Lamotrigine in Patient Plasma Using a Fast Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method With Backflush Technology. *Ther Drug Monit* [Internet]. 2015;37(2). Available from: https://journals.lww.com/drug-monitoring/fulltext/2015/04000/quantification_of_lamotrigine_in_patient_plasma.7.aspx

45. Hirano LQL, de Oliveira ALR, de Barros RF, Veloso DFMC, Lima EM, Santos ALQ, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dextroketa mine alone or combined with midazolam in Caiman crocodilus. *J Vet Pharmacol Ther* [Internet]. 2024 Apr 24 [cited 2024 May 13];n/a(n/a). Available from: <https://doi.org/10.1111/jvp.13447>

46. Heudi O, Barteau S, Picard P, Tremblay P, Picard F, Kretz O. Laser diode thermal desorption–positive mode atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry for the ultra-fast quantification of a pharmaceutical compound in human

plasma. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2011 Apr 5;54(5):1088–95. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708510006680>

47. Dion-Fortier A, Gravel A, Guérette C, Chevillot F, Blais S, Auger S, et al. Signal enhancement in laser diode thermal desorption-triple quadrupole mass spectrometry analysis using microwell surface coatings. *J Mass Spectrom* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2024 Apr 15];54(2):167–77. Available from: <https://doi.org/10.1002/jms.4328>

48. Choi H, Lee D, Kim Y, Nguyen HQ, Han S, Kim J. Effects of Matrices and Additives on Multiple Charge Formation of Proteins in MALDI–MS Analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* [Internet]. 2019 Jul 1;30(7):1174–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02213-7>

49. Springer V, Zhou Y, Aguilera ÁY, Emmer Å. User-friendly platform for analysis of high mass intact proteins and glycopeptides by laser desorption/ionization-mass spectrometry based on copper oxide particles. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2024 Feb 1;416(4):861–72. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00216-023-05072-0>

50. Luo X, Tue PT, Sugiyama K, Takamura Y. High yield matrix-free ionization of biomolecules by pulse-heating ion source. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Nov 9;7(1):15170. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15259-y>

51. Badjagbo K, Sauvé S. High-Throughput Trace Analysis of Explosives in Water by Laser Diode Thermal Desorption/Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem* [Internet]. 2012 Jul 3;84(13):5731–6. Available from: <https://doi.org/10.1021/ac300918f>

52. Boisvert M, Fayad PB, Sauvé S. Development of a new multi-residue laser diode thermal desorption atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry method for the detection and quantification of pesticides and pharmaceuticals in wastewater samples. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2012 Nov 19;754:75–82. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326701201416X>

53. Yao J, Scott JR, Young MK, Wilkins CL. Importance of matrix:analyte ratio for buffer tolerance using 2,5-dihydroxybenzoic acid as a matrix in matrix-assisted laser desorption/ionization-fourier transform mass spectrometry and matrix-assisted laser

desorption/ionization-time of flight. *J Am Soc Mass Spectrom* [Internet]. 1998 Aug 1;9(8):805–13. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044030598000464>

54. Peterson DS. Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2024 Nov 20];26(1):19–34. Available from: <https://doi.org/10.1002/mas.20104>

55. Sahasrabuddhe A, Oakley D, Chen K, McCarter JD. Development of a High-Throughput Affinity Mass Spectrometry (AMS) Platform Using Laser Diode Thermal Desorption Ionization Coupled to Mass Spectrometry (LDTD-MS). *SLAS Discov Adv Sci Drug Discov* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2024 Aug 3];26(2):230–41. Available from: <https://doi.org/10.1177/2472555220979596>

56. Lonappan L, Pulicharla R, Rouissi T, Brar SK, Verma M, Surampalli RY, et al. Diclofenac in municipal wastewater treatment plant: quantification using laser diode thermal desorption—atmospheric pressure chemical ionization—tandem mass spectrometry approach in comparison with an established liquid chromatography-electrospray ionization—tandem mass spectrometry method. *J Chromatogr A* [Internet]. 2016 Feb 12;1433:106–13. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967316000625>

57. Feist P, Hummon AB. Proteomic Challenges: Sample Preparation Techniques for Microgram-Quantity Protein Analysis from Biological Samples. *Int J Mol Sci*. 2015;16(2):3537–63.

58. Bynum ND, Moore KN, Grabenauer M. Evaluation of Laser Diode Thermal Desorption–Tandem Mass Spectrometry (LDTD–MS–MS) in Forensic Toxicology. *J Anal Toxicol* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2024 Nov 25];38(8):528–35. Available from: <https://doi.org/10.1093/jat/bku084>

59. Segura PA, Guillaumain C, Eysseric E, Boudrias J, Moreau M, Guérette C, et al. Ultrafast analysis of peptides by laser diode thermal desorption–triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* [Internet]. 2022 Oct 30 [cited 2024 Nov 25];36(20):e9373. Available from: <https://doi.org/10.1002/rcm.9373>

60. Cohen AF, Land GS, Breimer DD, Yuen WC, Winton C, Peck AW. Lamotrigine, a new anticonvulsant: Pharmacokinetics in normal humans. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 1987 Nov 1 [cited 2024 Aug 3];42(5):535–41. Available from: <https://doi.org/10.1038/clpt.1987.193>
61. Srichaiya A, Longchoopol C, Oo-puthinan S, Sayasathid J, Sripalakit P, Viyoch J. Bioequivalence of Generic Lamotrigine 100-mg Tablets in Healthy Thai Male Volunteers: A Randomized, Single-Dose, Two-Period, Two-Sequence Crossover Study. *Clin Ther*. 2008 Nov 1;30:1844–51.
62. Peck AW. Clinical Pharmacology of Lamotrigine. *Epilepsia* [Internet]. 1991 Jun 1 [cited 2024 Aug 3];32(s2):S9–12. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1991.tb05883.x>
63. Costa B, Silva I, Oliveira JC, Reguengo H, Vale N. Pharmacokinetic Simulation Study: Exploring the Impact of Clinical Parameters on Lamotrigine for Different Patient Populations with Implications for Liver Function Assessment and Therapeutic Drug Monitoring. *Sci Pharm*. 2024;92(1).
64. AB SCIEX. *Analyst® Software, User Guide*. Framingham, MA: AB SCIEX; 2017.
65. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. 2018.
66. Visconti G, Boccard J, Feinberg M, Rudaz S. From fundamentals in calibration to modern methodologies: A tutorial for small molecules quantification in liquid chromatography–mass spectrometry bioanalysis. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2023 Feb [cited 2023 Jun 29];1240:340711. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326702201282X>
67. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Número 27 [Internet]. ANVISA; 2012 [cited 2024 May 29]. Available from: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html
68. Methaneethorn J, Leelakanok N. Sources of lamotrigine pharmacokinetic variability: A systematic review of population pharmacokinetic analyses. *Seizure*

[Internet]. 2020 Nov 1;82:133–47. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1059131120302168>

69. Hotha KK, Kumar SS, Bharathi DV, Venkateswarulu V. Rapid and sensitive LC-MS/MS method for quantification of lamotrigine in human plasma: application to a human pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr* [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2023 Jul 23];26(4):491–6. Available from: <https://doi.org/10.1002/bmc.1692>

70. Fang L, Li Z, Kinjo M, Lomonaco S, Zheng N, Jiang W, et al. Generic lamotrigine extended-release tablets are bioequivalent to innovator drug in fully replicated crossover bioequivalence study. *Epilepsia* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2023 Jul 23];64(1):152–61. Available from: <https://doi.org/10.1111/epi.17438>

71. de Magalhães Benedetti IGN, Costa Veloso FMD, Nascimento LT, Almeida Diniz GD, Maione-Silva L, Lima ME. A Reliable HPLC-ELSD Method for Determination of Cholesterol, Phosphatidylcholine, Lysophosphatidylcholine Content and the Stability of a Liposomal Formulation. *Curr Pharm Anal* [Internet]. 2020;16(5):623–32. Available from: <http://benthamscience.com/article/98911>

72. Phoenix WinNonlin [Internet]. Mountain View, CA, USA.: Pharsight Corp.; [cited 2022 Oct 26]. Available from: <https://www.certara.com/software/phoenix-winnonlin/>

73. Ghatol S, Vithlani V, Gurule S, Khuroo A, Monif T, Partani P. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the estimation of lamotrigine in human plasma: Application to a pharmacokinetic study. *J Pharm Anal* [Internet]. 2013 Apr 1;3(2):75–83. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177912001086>

74. Kempka M, Sjödaahl J, Björk A, Roeraade J. Improved method for peak picking in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* [Internet]. 2004 Jun 15 [cited 2024 Apr 15];18(11):1208–12. Available from: <https://doi.org/10.1002/rcm.1467>

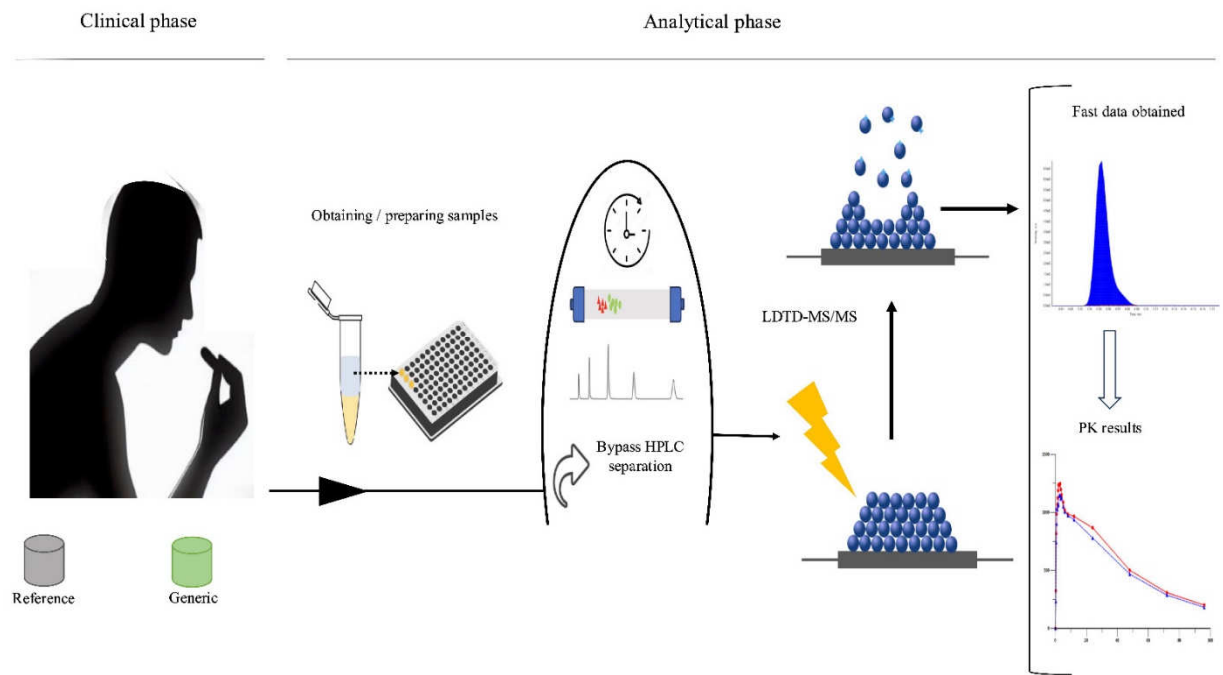
75. Williams-Pavlangos K, Wesdemiotis C. Advances in solvent-free sample preparation methods for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) of polymers and biomolecules. *Adv Sample Prep* [Internet]. 2023 Aug

- 1;7:100088. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772582023000384>
76. Tholey A, Heinzle E. Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry—applications and perspectives. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2006 Sep 1;386(1):24–37. Available from:
<https://doi.org/10.1007/s00216-006-0600-5>
77. Timofeeva I, Shishov A, Kanashina D, Dzema D, Bulatov A. On-line in-syringe sugaring-out liquid-liquid extraction coupled with HPLC-MS/MS for the determination of pesticides in fruit and berry juices. *Talanta* [Internet]. 2017 May 15;167:761–7. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914017300085>
78. Lin H, Lin L, Xu L, Xie Y, Xia Z, Wu Q. Liquid-liquid extraction pretreatment samples method used for pharmacokinetic study of rhubarb in rats after oral administrated. *J Tradit Chin Med Sci* [Internet]. 2018 Jul 1;5(3):291–301. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095754817301242>
79. Liu W, Nie H, Liang D, Bai Y, Liu H. Phospholipid imaging of zebrafish exposed to fipronil using atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Talanta* [Internet]. 2020 Mar 1;209:120357. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914019309907>
80. Li M, Wang H, Huan X, Cao N, Guan H, Zhang H, et al. Simultaneous LC-MS/MS bioanalysis of alkaloids, terpenoids, and flavonoids in rat plasma through salting-out-assisted liquid-liquid extraction after oral administration of extract from *Tetradium ruticarpum* and *Glycyrrhiza uralensis*: a sample preparation strategy to broaden analyte coverage of herbal medicines. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2021 Sep 1;413(23):5871–84. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03568-1>
81. Jogpethe A, Jadav T, Rajput N, Kumar Sahu A, Tekade RK, Sengupta P. Critical strategies to pinpoint carryover problems in liquid chromatography-mass spectrometry: A systematic direction for their origin identification and mitigation. *Microchem J* [Internet]. 2022 Aug 1;179:107464. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X22002922>

82. Fjording MS, Goodman J, Briscoe C. Cross-validation of pharmacokinetic assays post-ICH M10 is not a pass/fail criterion. *Bioanalysis* [Internet]. :1–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/17576180.2024.2418284>
83. Ventura S, Rodrigues M, Pousinho S, Falcão A, Alves G. Determination of lamotrigine in human plasma and saliva using microextraction by packed sorbent and high performance liquid chromatography–diode array detection: An innovative bioanalytical tool for therapeutic drug monitoring. *Microchem J* [Internet]. 2017 Jan 1;130:221–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X16303770>
84. Castel-Branco MM, Almeida AM, Falcão AC, Macedo TA, Caramona MM, Lopez FG. Lamotrigine analysis in blood and brain by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci App* [Internet]. 2001 May 5;755(1):119–27. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434701000445>
85. Rossen Koytchev UE. The use of truncated area under the curves in the bioequivalence evaluation of long half-life drugs. Studies with donepezil and memantine. *Arzneimittelforschung Drug Res*. 2011 Dec 15;58:255–8.
86. Daher A, Pinto DP, da Fonseca LB, Pereira HM, da Silva DMD, da Silva L de SFV, et al. Pharmacokinetics of chloroquine and primaquine in healthy volunteers. *Malar J* [Internet]. 2022 Jan 8;21(1):16. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-021-04035-z>
87. Ju G, Yan K, Xu Y, Chen S, Zheng Z, Qiu W. Evaluation of Bioequivalency and Pharmacokinetic Parameters for Two Formulations of Glimepiride 1-mg in Chinese Subjects. *Drug Des Devel Ther*. 2020 Jul 6;14:2637–44.
88. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Bioequivalence Studies with Pharmacokinetic Endpoints for Drugs Submitted Under an ANDA Guidance for Industry [Internet]. 2021. Available from: <https://www.fda.gov/media/87219/download>

89. Garnett WR. Lamotrigine: Pharmacokinetics. *J Child Neurol* [Internet]. 1997 Nov 1 [cited 2024 May 25];12(1_suppl):S10–5. Available from: <https://doi.org/10.1177/0883073897012001041>
90. Ramsay RE, Pellock JM, Garnett WR, Sanchez RM, Valakas AM, Wargin WA, et al. Pharmacokinetics and safety of lamotrigine (Lamictal®) in patients with epilepsy. *Epilepsy Res* [Internet]. 1991 Nov 1;10(2):191–200. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0920121191900125>

APÊNDICE A – Graphical abstract



APÊNDICE B – Artigo publicado

Título: High-Throughput Laser Diode Thermal Desorption-Tandem Mass Spectrometry Method for Rapid Determination of Lamotrigine in Human Plasma.

High-Throughput Laser Diode Thermal Desorption-Tandem Mass Spectrometry Method for Rapid Determination of Lamotrigine in Human Plasma

Glauco César F. F. Soares,^{*,a,b} Danilo F. M. C. Veloso,^{1b,a,c} Iram M. Mundim,^a Leonardo S. Teixeira,^a Maria Carolina Almeida^{1b,d} and Luiz Carlos da Cunha^b

^aInstituto de Ciências Farmacêuticas, Alameda Coronel Eugênio Jardim, 53, 74175-100 Goiânia-GO, Brazil

^bNúcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET), Universidade Federal de Goiás, 74605-170 Goiânia-GO, Brazil

^cSecretaria de Estado da Educação do Estado de Goiás (SEDUC), Av. Quinta Avenida, quadra 71, No. 212, Setor Leste Vila Nova, 74643-030 Goiânia-GO, Brazil

^dInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFG), Campus Inhumas, Avenida Universitária, Vale das Goiabeiras, 75402-556 Inhumas-GO, Brazil

We present the development and validation of a laser diode thermal desorption coupled with mass spectrometry (LDTD-MS/MS) as a high-throughput method for bioanalysis. This technique was applied clinically to determine the pharmacokinetics (PK) of the anticonvulsant drug lamotrigine (LAM) after administering two different oral formulations. Our method offers significant advantages over liquid chromatography in terms of sustainability. Sample preparation required just 50 μL of human plasma. Liquid-liquid extraction (LLE) overcomes protein precipitation for sample cleanup while avoiding any compromise in the desorption and ionization of LAM, thereby eliminating the need for microwell surface coating. This validated, internationally compliant method provided ultra-rapid LAM plasma level determination, with a 10 s runtime *per* sample. The linearity range of 20-2000 ng mL^{-1} effectively enabled the full capture of the PK profile of 36 volunteers. Such findings highlight the versatility of this approach, demonstrating its potential to align with evolving regulatory standards and potentially paving the way for its broader adoption in routine bioanalysis.

Keywords: pharmacokinetics, ultrafast analysis, bioanalysis, drug monitoring, clinical application

Introduction

Analytical methods based on laser diode thermal desorption (LDTD) have demonstrated remarkable versatility and effectiveness, encompassing a wide range of applications. When integrated with mass spectrometry (MS/MS), LDTD significantly enhances the efficiency of analytical method development, making it an invaluable tool in bioanalytical science.¹⁻⁵

In the current landscape, there is an increasing demand for analytical methods that deliver precision and sensitivity and align with sustainability principles.⁶ These capabilities are crucial for tackling time-sensitive challenges like

expiring drug patents and giving a competitive edge to pharmaceutical companies by quickly launching generic products.⁷⁻¹¹

While liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS/MS) remains the gold standard in bioanalysis owing to its high selectivity, sensitivity, and precision, its analysis time (1-20 min) is limited by automated steps such as sample injection, washing cycles, and chromatographic separation.¹²⁻¹⁷

Unlike classical LC methods, LDTD-MS/MS obviates the reliance on organic solvents, streamlines sample preparation, reduces cross-contamination, and enhances reproducibility.^{1,17}

In LDTD-MS/MS, samples are spotted onto a 96-microwell plate, evaporated, and thermally desorbed by an infrared laser. The vaporized analytes are then carried by

*e-mail: glauco.faria@icf.com.br

Editor handled this article: Andréa R. Chaves (Associate)



gas to an atmospheric pressure chemical ionization source and analyzed by the mass spectrometer.¹

Analyte desorption and ionization from the LDTD plate can be significantly improved by using a microwell surface coating.¹⁸ Typically composed of stabilizers like bovine serum albumin and surface modifiers such as potassium phosphate,¹⁹⁻²¹ the coating enhances energy transfer, promotes uniform laser pulse absorption, and reduces thermal degradation and fragmentation. As a result, it improves analyte ionization, stability, and overall performance.²²⁻²⁵

LDTD-MS/MS offers a streamlined approach to sample analysis by bypassing the time-consuming LC separation step.²⁶ This speeds up sample processing and analysis while reducing costs associated with chromatographic consumables turnover, particularly for biological sample analysis. Despite advancements, the principle of the LDTD-MS/MS method relies on thermal desorption and restricts its use with thermally unstable analytes.²⁷⁻²⁹

Furthermore, the lack of chromatographic separation can hinder calibration and quantification due to matrix interferences, reducing specificity and impairing the differentiation of structurally similar compounds or isomers. These limitations highlight the importance of careful analyte screening and evaluating the suitability of the method for bioanalytical studies.^{27,30}

In this study, lamotrigine (LAM), an anticonvulsant drug prescribed for epilepsy and bipolar disorder, is evaluated using the approach mentioned, given its unique physicochemical properties. These properties make it an excellent candidate for precise quantification in complex biological matrices via LDTD-MS/MS.^{31,32} LAM is rapidly and completely absorbed after oral administration, with nearly 100% bioavailability. However, plasma levels can fluctuate significantly as a result of factors like drug interactions and pregnancy, highlighting the need for therapeutic monitoring.^{33,34}

Therefore, this study aims to develop and validate a rapid bioanalytical method for LAM quantification in human plasma employing a high-throughput LDTD-MS/MS instrument.

Experimental

Materials

LC-MS/MS grade, methanol, acetonitrile, methyl *tert*-butyl ether, and formic acid (99.5%) were products of J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Water was obtained using a Milli-Q system (Millipore, Billerica, MA, USA) equipped with a 0.22 mm pore end-filter. Bovine serum albumin, potassium phosphate, and United States

Pharmacopoeia (USP) reference standards LAM and carbamazepine were acquired from Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA). Reference drug at the dose of 100 mg is a product of GSK (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) that was purchased in local market.

Methods

Preparation of standard solutions: stock solutions of LAM and carbamazepine, used as the internal standard (IS), were prepared in acetonitrile (ACN) at a concentration of 10.000 ng mL⁻¹. Standard working solutions for calibration were prepared by appropriate dilution with ACN:H₂O (1:1, v/v) from the stock solution, resulting in LAM concentrations of 20; 60; 200; 500; 1000; 1200; and 2000 ng mL⁻¹. Quality control (QC) samples were prepared at three concentrations: low (LQC), medium (MQC), and high (HQC) at a concentration of 60; 1000, and 1600 ng mL⁻¹, respectively. IS working solution at 2000 ng mL⁻¹ was prepared in the same way.

Mass spectrometry LDTD optimization

LAM and IS were detected and quantified using an API6500 triple quadrupole mass spectrometer MDS-SCIEX (Concord, Ontario, Canada). The setup for both drugs comprised a dwell time of 70 ms *per* transition; the curtain gas was set to 10 and the collision-activated dissociation (CAD) gas level adjusted to medium. Additional MS conditions included collision exit potential of 24 V for LAM and 22 V for IS, and a collision energy of 35 for LAM and 25 for IS, respectively. Multiple reaction monitoring (MRM) was employed to enhance the sensitivity and specificity of drug detection. For each drug, the two most abundant transitions were monitored in MRM mode, with one transition from each drug selected for further validation. LDTD Phytronix Technologies (Quebec, Canada) source operation involved configuring the carrier gas flow at 6.0 L min⁻¹ and establishing the final laser pattern at 70%, initiated by a gradual increase from 68%. Data acquisition and processing were obtained using Analyst[®] software³⁵ version 1.7.2 (AB SCIEX, Framingham, MA).

Sample preparation and extraction procedure

Protein precipitation was used as a mixture of 50 µL of plasma, 10 µL of standard solution (at 60 ng mL⁻¹), and 10 µL of IS solution (at 2000 ng mL⁻¹) in 400 µL of methanol as the precipitating solvent. Subsequently, the resulting mixture was vigorously vortexed for 5 min. The obtained solution was then centrifuged at 12000 rpm for 10 min.

Liquid-liquid extraction (LLE) was also used by adding 50 μL of plasma, 10 μL of standard solution, and 10 μL of IS at the same concentration of protein precipitation assay, combined in a 2.0 mL Eppendorf tube. Subsequently, 1250 μL of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) were added, and the mixture was stirred for 2 min. Following, the solution was centrifuged at 12000 rpm for 10 min to assist with phase separation. In a Phytronix LazWell® 96-microwell plate (Phytronix Technologies, Quebec, Canada), 180 μL of the extracted sample were spotted and dried at 40 °C using a dry block. Then, the dried samples were reconstituted with 100 μL of a methanol:water mixture (1:1, v/v) and shaken for 8 s at 1200 rpm using a thermo-shaker. In both extraction methods, any calibration standard and quality control sample required spiking 10 μL of standard solution into plasma. This step was not applied to clinical samples.

After sample cleanup, desorption efficiency was optimized under laser irradiation by spotting 2.5 μL of the obtained solution onto the Phytronix LazWell® 96-microwell plate and dried for 5 min under a gentle stream of nitrogen before the LDTD-MS/MS analysis.

To enhance the ionization and stability of the extracted sample, 2.5 μL of a substrate mixture (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bovine serum albumin and 1 mM potassium phosphate) were incorporated into the obtained solution and placed in the microwell. This process is referred to as microwell surface coating.

Validation process

The validity of the bioanalytical method was confirmed by approaches in compliance with the FDA Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry³⁶ guidelines, as well as the recommendations put forth by Visconti *et al.*,³⁷ the Brazilian regulatory agency, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA),³⁸ and aligned with the principles established by the International Council for Harmonisation (ICH).³⁹ The assessment encompassed various parameters including selectivity, linearity, limits of detection and quantification, bias, precision, matrix effect, carry-over, and sample stability in different stress and storage conditions.

Matrix effect

The matrix effect was evaluated at LQC and HQC levels. A total of 16 human plasma samples for each concentration were used in this assay, consisting of 8 batches: 4 normal, 2 hemolyzed, and 2 lipemic. The other set of 8 human plasma samples with the same composition was prepared, each one spiked with common over-the-counter drugs at the following concentrations: paracetamol

(20000.00 ng mL⁻¹), caffeine (1000.00 ng mL⁻¹), scopolamine butyl bromide (2.00 ng mL⁻¹), 4-methylamino antipyrine (8000.00 ng mL⁻¹), cotinine (1500.00 ng mL⁻¹), and ondansetron (1500.00 ng mL⁻¹). The human plasma samples were processed following the procedure outlined in the “Sample preparation and extraction” sub-section. After extraction, the matrix was spiked with LAM at concentrations equivalent to the LQC and HQC levels. Mean peak areas of LAM in the spiked blank matrix and in ACN:H₂O (1:1, v/v) solution were obtained. The procedure for validating this parameter necessitates the acquisition of the normalized matrix factor (NMF) from both QCs. NMF results are obtained following the equation 1:

$$\text{NMF} = \frac{\text{analyte peak area in matrix/IS peak area in matrix}}{\text{analyte peak area in solution/IS peak area in solution}} \quad (1)$$

Subsequently, the coefficient of variation (CV) in percentage, for the NMFs of LQC and HQC samples should be computed, ensuring it remains below 15% (fifteen percent), as stipulated by ANVISA.³⁸

Specificity

The potential interference of endogenous plasma components and concomitant medications with LAM and IS ionization was evaluated. The assessment involved 12 human blank plasma samples, divided into two sets. The first set included six batches (four normal, one hemolyzed, and one lipemic). The second set consisted of six similarly composed batches spiked with concomitant drugs used in the matrix effect assay. All samples were processed and analyzed according to the proposed extraction protocol and the established equipment conditions for LAM and IS. The specificity of the method was considered acceptable if, in the different blank plasma samples, no desorption peak exhibited an area exceeding 20% of the LLOQ area for LAM or 5% of the IS area.

Carry-over

In this assay, a blank plasma sample was analyzed three times. The first analysis was conducted before any setup to establish a baseline. Subsequently, two additional analyses of the blank plasma sample were performed immediately after the analysis of the ULOQ, which contained the IS at a concentration of 2000 ng mL⁻¹. For reference, a lower limit of quantitation (LLOQ) sample was also analyzed, and its peak area was used as a benchmark. Carry-over was considered significant if the desorption peak area of the blank plasma sample exceeded 20% of the LLOQ peak area or 5% of the IS peak area.

Sensitivity and linearity

The linearity range was determined by considering the maximum plasma concentration of the drug over time (C_{\max}) obtained from prior pharmacokinetics (PK) and bioequivalence studies.⁴⁰⁻⁴² It was ensured that the range analyzed was not excessively narrow and did not exceed values achievable in volunteers, covering the full PK profile of a single dose of LAM orally administered. Linearity was examined by analyzing duplicate calibration standards across seven concentration levels over three consecutive days. The curves were generated by plotting the peak area ratio of LAM to the IS against each respective concentration.

Determination of the calibration curve was undertaken through least squares analysis. The calibration curve was deemed acceptable only if the residuals fell within a 20% margin at the LLOQ and within a 15% margin at all other calibration levels, with a stipulation that at least two-thirds of the calibration standards adhered to this criterion, accounting for both the highest and lowest concentrations. For the sensitivity of the assay, the LLOQ was established at the concentration where precision and accuracy were upheld within a 20% threshold, as determined through the analysis of seven replicates. Precision was characterized by the coefficient of variation, and accuracy, denoted by the relative deviation expressed as a percentage error from the target concentrations, was assessed across LLOQ (20 ng mL⁻¹) and all three-quality control (QC) levels of 60, 1000, and 1600 ng mL⁻¹. Intra-run accuracy and precision were assessed by analyzing three replicates of samples at the LLOQ and each QC level on the same day. Inter-run accuracy and precision were evaluated using three replicates ($n = 3$) *per* concentration across three days.

Linearity was assessed within the standard concentration range of 20-2000 ng mL⁻¹ in human plasma. The correlation between peak area ratio and LAM nominal concentration was determined using $1/x^2$ weighted linear regression. To establish the calibration curve, the accuracies of at least 75% of the calibration standards, including the LLOQ and ULOQ, had to fall within the $\pm 15.0\%$ range ($\pm 20.0\%$ at LLOQ), and the correlation coefficient (r^2) needed to be greater than 0.99. The lowest concentration on the calibration curve that could be reliably determined was then determined.

Stability assessments

Stability assessment of LAM and IS in human plasma involved exposure to different storage and stress conditions,⁴³ including four complete freeze-thaw cycles (-70 ± 15 °C to room temperature, approximately 20 °C for 45 min, back to -70 ± 15 °C, and stored for 24 h),

short-term bench stability (ca. 4 h), and autosampler stability (1.93 h), under controlled laboratory conditions (approximately 20 °C) and long-term stability 2.5 months at -70 ± 15 °C. Stability studies were conducted at low and high QC levels (60 and 1600 ng mL⁻¹, respectively) in six replicates. Stability was deemed acceptable when the concentrations of stored stability samples remained within 85 to 115% of their nominal values. This was assessed by comparing them to freshly prepared calibration curves and QC samples, with results expressed as relative error (RE) in percentage.

Method application in comparative PK of LAM tablets

The clinical trial was designed as a monocentric, open-label, crossover, randomized study with two arms treatment (reference and test), two sequences (reference-test and test-reference), and two periods. It was conducted under truncated fasting conditions, focusing on a single subgroup of 36 healthy volunteers of both sexes. Each participant received a single dose of either the reference drug or the test formulation, in an equivalent dose of 100 mg of LAM tablets. Blood samples were collected using ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as an anticoagulant at pre-dose and specific post-dose time points: 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 48, 72 and 96 h. Immediately after collection, samples were centrifuged at 3,000 rpm for 5 min. The plasma supernatant was carefully separated and stored at $-70 (\pm 15$ °C) within 2 h of centrifugation. Subsequently, LAM was extracted from the plasma samples using the previously described extraction methods, followed by analysis using LDTD-MS/MS. The protocol number of the trial 5.610.806 was approved by the research ethics Committee of Instituto de Ciências Farmacêuticas. Primary PK parameters were determined using non-compartmental analysis in Phoenix WinNonlin^{®44} v.6.4.0.768 (Pharsight, Mountain View, CA).

Results and Discussion

Sample preparation and LDTD-MS/MS detection

The monitoring of LAM was carried out using the most intense precursor-to-product ion transition (m/z 256.2 \rightarrow m/z 211.0). Figure 1a illustrates the precursor ion, corresponding to the protonated molecules $[M + H]^+$. Following collision-induced dissociation, the most stable and abundant fragment is observed in Figure 1b, which corresponds to the cleavage of the triazine ring from the protonated molecule in positive ion mode during MRM.⁴⁵

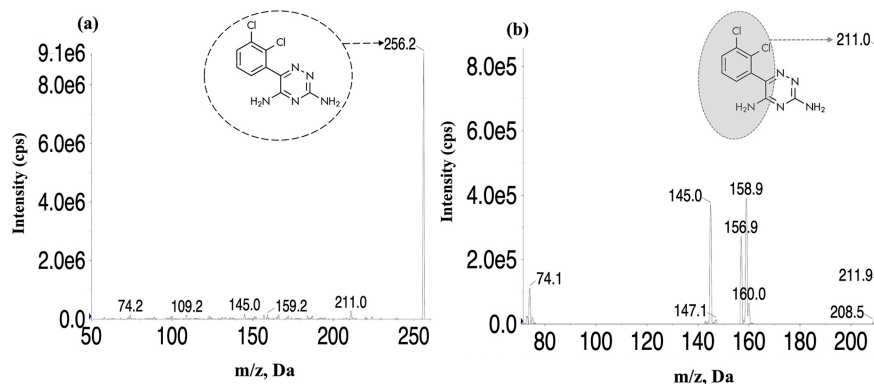


Figure 1. Representative mass spectrum of LAM obtained in positive ionization mode, showing the precursor ion (a) at m/z 256.2 Da and the product ion (b) at m/z 211.0 Da. MS data were acquired under the following parameters: a dwell time of 70 ms, a curtain gas flow rate of 10, and the CAD gas was adjusted to medium. The collision exit potential was 24 V, and the collision energy was set to 35 V. To enhance sensitivity and specificity, multiple reaction monitoring (MRM) mode was employed. The relative abundance of the selected ions is measured in counts *per s* (cps).

Refining the sample preparation protocol is pivotal for optimizing LDTD-MS/MS analysis,^{46,47} as demonstrated in this study. Remarkable differences observed in plasma samples subjected to different extraction methods are shown in Figures 2 and 3. Notably, protein precipitation extraction yielded distinct peaks for both LAM (Figure 2a) and IS (Figure 2b). However, in the blank plasma samples (Figures 2c and 2d), a sharp peak is evident in Figure 2c, likely due to interference from the matrix.

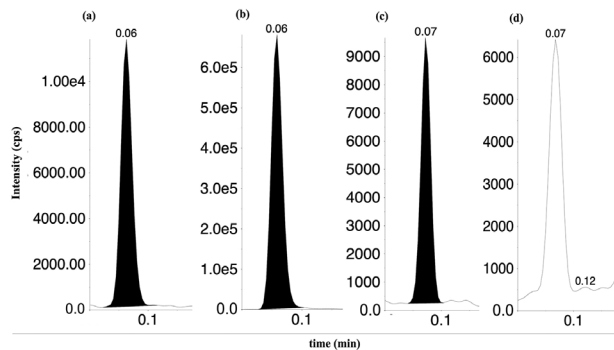


Figure 2. Desorption profiles for LAM and IS by protein precipitation (using microwell surface coating and the laser power set at 68%): (a) desorption peak for LAM-containing sample, (b) desorption peak for IS-containing sample, (c) LAM desorption peak observed in the blank plasma sample, and (d) no desorption peak detected in the blank plasma sample for IS. Desorption peaks were detected between 0.06–0.07 min at 60 and 2000 ng mL⁻¹ concentrations for LAM and IS, respectively. The y-axis represents the desorption peak intensity, measured in counts *per s* (cps).

Conversely, while LLE excelled in impurity removal, the incorporation of microwell surface coating, comprising a solvent-matrix-cationized salt blend aimed at enhancing ionization yielded unexpected outcomes.⁴⁸

In contrast to the ionization enhancement observed with the microwell surface coating in the precipitation extraction assay, its use in LLE appeared counterproductive, suppressing ionization and causing a significant reduction

in signal intensity (Figures 3a and 3b). Nevertheless, the use of LLE for sample cleanup significantly reduced interference in the LAM analysis channel, as no desorption peaks were observed in Figures 3c and 3d, demonstrating its superior efficacy in sample purification.^{49,50}

To address the potential ionization suppression caused by the microwell surface coating in LLE samples, the laser power was strategically increased. This adjustment effectively enhanced the peak intensity (Figures 3e and 3f), resulting in no interferences at LAM and IS desorption times (Figures 3g and 3h). As a result, the analysis became more accurate and selective, eliminating the need for reliance on the microwell surface coating in the samples.

The increased laser intensity enhanced the energy transfer to the sample and the amount of material thermally desorbed into the gas phase, significantly minimizing the impact of interfering contaminants released during desorption. In addition, the favorable ionization properties of LAM, combined with its well-documented stability under heat, humidity, and light conditions, make this drug a viable choice for analysis using LDTD-MS/MS.^{18,32,51}

Moreover, LLE proved to be highly effective, yielding optimal results for LAM analysis. Using 50 μ L of human plasma minimizes biological material use while ensuring sufficient matrix representation. Although a relatively large volume of 1250 μ L of organic solvent was used in the extraction process, this solvent plays a crucial role in effectively cleaning up the plasma sample while maximizing the partitioning of LAM. Since chromatographic separation is not employed, this approach ensures reliable quantification by balancing drug solubility, matrix cleanup, and method compatibility.⁵² Given these findings, the method was validated using LLE and eliminating the additional microwell surface coating step. This optimization strategy represents a crucial advancement in LDTD-MS/MS analysis, ensuring accurate and reliable detection of LAM.

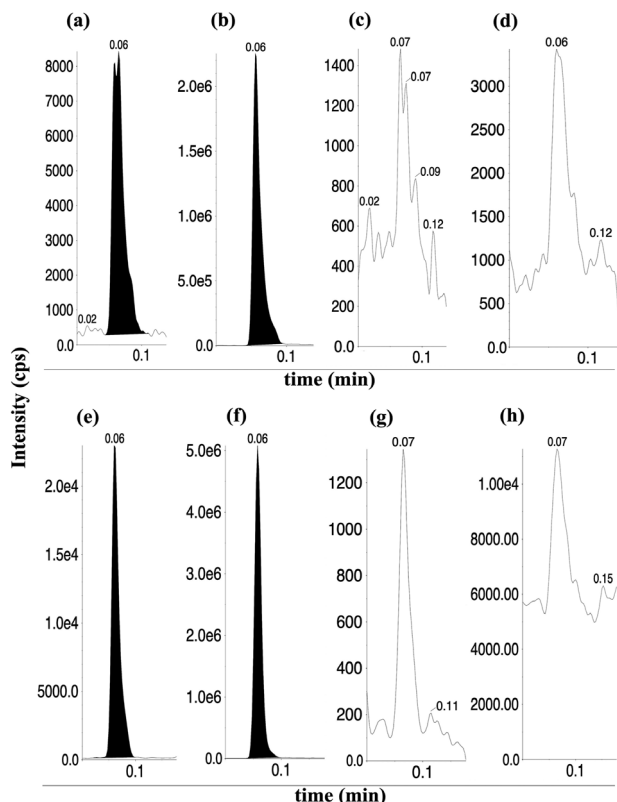


Figure 3. Desorption profiles for LAM and IS in LLE (using microwell surface coating and the laser power set at 68%): (a) desorption peak for LAM-containing sample, (b) desorption peak for IS-containing sample, (c) no desorption peak observed in the blank plasma sample for LAM, and (d) no desorption peak detected in the blank plasma sample for IS. For LLE (uncoated samples and the laser power set at 70%): (e) prominent desorption peak for LAM-containing sample, (f) prominent desorption peak for IS-containing sample, (g) no desorption peak observed in the blank plasma sample for LAM, and (h) no desorption peak detected in the blank plasma sample for IS. Desorption peaks were detected between 0.06–0.07 min at 60 and 2000 ng mL⁻¹ concentrations for LAM and IS, respectively. The y-axis represents the desorption peak intensity, measured in counts *per s* (cps).

Method validation process

Sensitivity and linearity: LAM met the ANVISA³⁸ acceptance criteria with a seven-point calibration curve.

Table 1. Intra-run and inter-run precision and accuracy results of LAM in human plasma using LDTD-MS/MS analysis

LAM nominal concentration / (ng mL ⁻¹)	Intra-run			Inter-run		
	Measured concentration ± SD / (ng mL ⁻¹)	Precision / %	Accuracy / %	Measured concentration ± SD / (ng mL ⁻¹)	Precision / %	Accuracy / %
20 (LLOQ)	19.3 ± 2.1	10.88	-3.50	18.3 ± 2.3	12.57	-8.50
60 (LQC)	59.6 ± 6.9	11.58	-0.67	61.1 ± 5.4	8.84	1.83
1000 (MQC)	992.2 ± 118.9	11.98	-0.78	1000.0 ± 90.0	9.00	0.00
1600 (HQC)	1547.1 ± 116.4	7.52	-3.31	1595.8 ± 130.8	8.20	-0.26

LAM: lamotrigine; SD: standard deviation; LLOQ: lower limit of quantification; LQC: low concentration; MQC: medium concentration; HQC: high concentration.

Calibration curves exhibited excellent linearity across the investigated concentration range (20–2000 ng mL⁻¹), boasting correlation coefficients (r^2) surpassing 0.99 in all instances.

Furthermore, all back-calculated standard concentrations fell within a 15% deviation from the nominal value, meeting the stringent criterion set at a maximum allowable deviation of 20%, even at the LLOQ. Notably, the residuals displayed no discernible trend concerning to concentration. The precision and accuracy data for intra- and inter-run analyses are succinctly presented in Table 1. Based on these results, the assay demonstrates both accuracy and precision for LAM within the explored concentration range.

Intra-run results were obtained by analyzing three replicates of samples at the LLOQ and each QC level within a single day. Inter-run results involved three replicates *per* concentration analyzed across three consecutive days. The LLOQ (lower limit of quantification) was set at 20 ng mL⁻¹, while QC levels included low (LQC, 60 ng mL⁻¹), medium (MQC, 1000 ng mL⁻¹), and high (HQC, 1600 ng mL⁻¹). Measured concentrations are reported as means ± standard deviation ($n = 3$ *per* concentration).

Matrix effect

The normalized matrix factor (NMF) results obtained for the LQC level were 0.78 ± 0.070 , while for the HQC level, they were 0.02 ± 0.00 . In both cases, the CV was within the acceptable limit of 15%, as established by ANVISA³⁸ guidelines. Specifically, the CV values were 8.32 and 7.12% for the LQC and HQC NMF, respectively. These results demonstrate compliance with the regulatory threshold and confirm the absence of significant matrix interference in determining the LAM and IS desorption peak areas. In this fashion, no evidence of matrix effects at any analyzed concentrations of the monitored drug and IS arises from the interplay between the impact of the matrix on the ion source or their chemical characteristics.

Specificity

Outcomes of the specificity test underscored the absence of contamination exceeding 20% of the LLOQ peak area for LAM within the desorption peaks detection window (0.06 min) across all analyzed samples. Blank plasma samples, regardless of their normal, lipemic, or hemolyzed state, displayed contamination levels ranging from 1.54 to 5.68% of the LLOQ area. Additionally, the same aforementioned plasma batches contaminated with the drugs outlined in the methodology exhibited contamination limits capped at 15.35% of the LLOQ area. Concerning the IS, the desorption peak areas detected at 0.05 min ranged from 0.13 to 0.34%, remaining within the predefined 5.0% limit for the IS.

Carry-over

In high-performance liquid chromatography (HPLC) tests, carry-over poses a significant challenge, stemming from residues that may adhere within the chromatographic separation system.⁵³ This issue can lead to contamination of subsequent samples, particularly those with lower concentrations or blank samples, potentially compromising the integrity of the analysis. Effective resolution or mitigation of this problem is paramount in such analyses. In the carry-over validation assay, the desorption peak areas for LAM and IS in blank samples analyzed before any setup were 1003 and 4920, respectively. For comparison, the LLOQ and IS areas of 35908 and 5270257, respectively, were also obtained. After the ULOQ (2872851) and IS (5387863) areas were obtained, the initial blank sample was reanalyzed twice, resulting in desorption peak areas of 570 and 1135 for LAM and 4677 and 3901 for IS, respectively. Notably, our results demonstrated robust

performance with no desorption peak areas exceeding the established thresholds of 20% of the lower limit of quantification (LLOQ) for LAM or 5% for IS. This outcome underscores the efficiency of the LDTD-MS/MS analysis system compared to HPLC¹⁷ coupled with MS/MS systems. Unlike the latter, which necessitates extensive washing of the injection needle with various solvents, resulting in up to a minute increase in analysis time, the simplicity of the LDTD-MS/MS system contributes to reduced risk of carry-over contamination.

Stability

Outcomes of the stability studies indicate that LAM concentrations remained consistent under the applied stress conditions, maintaining integrity at both concentration levels (HQC and LQC). Furthermore, when stored at room temperature (20 °C), LAM demonstrated stability in plasma samples for up to 4 h. Post-sample preparation at 20 °C, LAM retained stability for 1.96 h in post-preparative stability assessments. Moreover, LAM exhibited no significant fluctuations in LAM concentrations even after undergoing four complete freeze-thaw cycles, or during a 2.5-month long-term stability test, as well as the aforementioned stability tests, with analyte content consistently within 15% of the nominal concentration. Table 2 displays a comprehensive overview of all stability results.

Our consistent validation results substantiate the selection of LDTD-MS/MS over conventional HPLC-MS/MS, owing to its enhanced analytical speed, reduced solvent consumption, and greater suitability for the specific analyte under investigation. The validation results presented in this study confirm that this method meets the requirements outlined in RDC 27/2012, fully adhering to the regulatory

Table 2. Overview of LAM stability in human plasma under various laboratory conditions

Stability test	Sample	Measured concentration ± SD / (ng mL ⁻¹)	RE / %
Freeze-thaw cycles (4 cycles)	LQC	63.1 ± 3.76	5.19
	HQC	1716.7 ± 40.50	7.29
Short-term (06.58 h/20 °C)	LQC	59.6 ± 4.25	-0.67
	HQC	1625.0 ± 131.26	1.56
Post-preparative stability (LDTD plate for 1.93 h, and ca. 20 °C)	LQC	62.3 ± 2.71	3.83
	HQC	1684.7 ± 100.85	5.29
Long-term stability (2.5 months at -70 ± 15 °C)	LQC	54.83 ± 4.13	-8.61
	HQC	1460.82 ± 105.66	-8.70

Stability results of LAM in human plasma under various temperatures and storage conditions (n = 6, mean ± SD) at concentrations of 60 ng mL⁻¹ (low-quality control) and 1600 ng mL⁻¹ (high-quality control). samples Relative error (RE%), calculated as the percentage difference between measured and nominal concentrations, was used to determine stability. SD: standard deviation; LDTD: laser diode thermal desorption; LQC: low concentration; HQC: high concentration.

standards established by ANVISA,³⁸ thereby demonstrating its scientific and regulatory robustness for the intended application.

While our LDTD-MS/MS approach proved highly versatile and adaptable, it is essential to address its current limitations, particularly to meet the ICH M10³⁹ guideline updates: Incurred Sample Reanalysis (ISR) and cross-validation. At the time this study was conducted, these requirements had not yet been incorporated into the regulatory framework of ANVISA.³⁸ ISR is particularly relevant for studies involving high sample heterogeneity, where variability in plasma protein binding, endogenous compounds, or matrix effects may compromise the consistency between validation and research samples. Similarly, cross-validation is critical when methodological changes, such as using LDTD-MS/MS instead of HPLC-MS/MS, significantly alter analytical conditions, warranting comparative evaluations across platforms.^{38,54}

As ANVISA aligns with the updated ICH M10 guidelines, integrating these additional assessments into future studies will strengthen the reliability, flexibility, and compliance of the method with evolving global regulatory expectations and the dynamic landscape of bioanalytical science.

Clinical application of the LDTD-MS/MS method in a comparative PK study

The developed and validated LDTD-MS/MS method proved effective in a clinical trial, enabling the assessment of the PK of two distinct oral tablet formulations of LAM. Through this method, precise quantification of LAM concentrations within the linearity range of 20 to 2000 ng mL⁻¹ was achieved for a duration of up to 96 h post-administration of the formulations. Overall, compared

to previously reported methods for quantifying LAM in plasma samples as such,^{42,55,56} our method offers several significant advantages. These include the use of a tiny biological sample volume, a straightforward extraction procedure with enhanced sensitivity, a large dynamic range, and the shortest total analysis time reported for this drug. To the best of our knowledge, this is the first bioanalytical method utilizing LDTD-MS/MS for the quantitation of this antiepileptic drug in human plasma.

Figure 4 illustrates the mean plasma concentration-time profiles of LAM following a single oral dose of the reference formulation and the test tablet formulation, respectively. The primary PK parameters of LAM for the tablet formulations are summarized in Table 3.

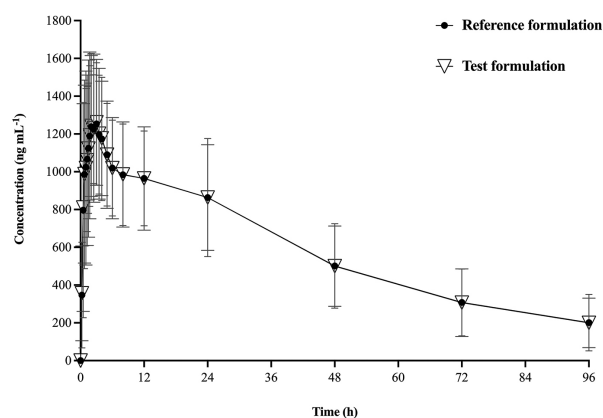


Figure 4. The pharmacokinetic profile of LAM following oral administration of two different formulations is depicted as plasma concentration *versus* time (area under curve from zero to 96 h, AUC_{0-96}). The reference formulation (●) and the test formulation (▽) were each administered as a single 100 mg dose to 36 healthy, fasting volunteers. The two groups did not show any meaningful distinctions. Vertical bars indicate mean standard error.

The PK analysis demonstrated comparable performance between the reference and test tablet formulations of

Table 3. Key pharmacokinetics (PK) parameters of LAM following a 100 mg dose of reference and test tablet formulations in healthy volunteers

PK parameter	Method of calculating	Reference		Test	
		Average	SD	Average	SD
$AUC_{0-96} / (\text{ng mL}^{-1} \text{h})$	trapezoids	55469.78	17497.8	51616.36	17202.21
$T_{\text{max}} / \text{h}$	observed	1.66	0.62	2.45	0.72
$C_{\text{max}} / (\text{ng mL}^{-1})$	observed	1516.42	361.34	1425.41	373.36
$V_z/F / L$	$\frac{Cl}{F} / k_e$	80.77	22.97	83.77	14.93
$Cl/F / (L \text{ h}^{-1})$	dose/AUC	1.77	0.57	1.96	0.69
$t_{1/2} / \text{h}$	$0.693/k_e$	35.09	8.40	33.71	6.73

Plasma PK characteristics of LAM under fasting conditions. AUC_{0-96} : area under the plasma concentration-time curve after the last dose from zero time to the last time point of 96 h; T_{max} : observed time to reach C_{max} ; C_{max} : maximum observed plasma concentration after drug administration; V_z/F : apparent volume of distribution; Cl/F : the apparent clearance; $t_{1/2}$: drug half-life, k_e : elimination rate constant, often obtained from the slope of the terminal phase of a semi-logarithmic plasma concentration-time curve, and $0.693 = \ln 2$. PK parameters were calculated by the non-compartmental analysis. SD: standard deviation.

LAM. Both formulations achieved similar drug exposure, as reflected in their area under curve (AUC) values, with slightly different T_{\max} and C_{\max} (maximum observed plasma concentration after drug administration). The apparent clearance (CL/F) and volume of distribution (Vz/F) were also closely aligned, suggesting comparable drug distribution and elimination profiles. The findings indicate that the formulations presented similar absorption, distribution, and clearance.

The PK results also show that drug half-life ($t_{1/2}$) of both the reference and test formulations exceeds 24 h, confirming the classification of LAM as a long half-life drug under established guidelines. Such data confirms the suitability of the method and the robustness of the experimental design, supporting the use of the truncated AUCs for long $t_{1/2}$ drugs to ensure comparability of absorption processes while minimizing unnecessary and potentially unethical prolonged sampling periods.⁵⁷⁻⁶⁰

Moreover, the PK profile obtained aligns with previous studies on oral administration of LAM in healthy volunteers.^{40,61,62}

Conclusions

A rapid, high-throughput method for quantifying LAM in human plasma using LDTD-MS/MS was successfully developed and validated. LDTD-MS/MS offers key advantages, including minimal plasma volume requirements, high sensitivity, repeatability, low matrix interference, and adequate LAM and IS selectivity. Our method features a more sustainable approach by bypassing the chromatographic separation process. Effective sample cleanup was achieved through an optimized extraction method, simplifying the process and enhancing specificity with LDTD-MS/MS analysis. The linearity range of 20 to 2000 ng mL⁻¹ was suitable for quantifying LAM in human plasma for up to 96 h, enabling the determination of key PK parameters for two different oral formulations. In our current state of knowledge, this study represents the first literature report of a bioanalytical method for quantitating LAM using LDTD-MS/MS. Looking toward the future, we plan to develop and validate LDTD-MS/MS methods that integrate the latest ICH M10 guideline recommendations, including cross-validation and ISR. By addressing these essential aspects, we aim to strengthen the alignment of this approach with global standards and explore its potential applications in bioanalysis and beyond.

Acknowledgments

The authors would like to thank Fundação de Amparo

à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and especially acknowledge the Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF) for providing support in the form of analytical and clinical data used in this study. The bioanalytical method and pharmacokinetic data presented in this manuscript were generated as part of an exploratory study on the LDTD-MS/MS method, conducted independently of regulatory submissions or marketing approval processes for any drug or pharmaceutical product.

Author Contributions

Glauco César F. F. Soares and Danillo F. M. C. Veloso contributed equally to conceptualization, formal analysis, investigation, data curation, writing (original draft, review, and editing), and visualization; Iram M. Mundim was involved in conceptualization, investigation, data curation, and writing (review and editing); Maria Carolina Almeida contributed to formal analysis, methodology, validation, visualization, and writing (review and editing); Leonardo S. Teixeira and Luiz Carlos da Cunha were responsible for conceptualization, investigation, writing (original draft, review, and editing), visualization, and supervision.

References

1. Picard, P.; Letarte, S.; Rochon, J.; Paquin, R. E. In *High-Throughput Mass Spectrometry in Drug Discovery*, 1st ed.; Liu, C.; Zhang, H., eds.; John Wiley & Sons, Inc.: London, UK, 2023. [Link] accessed in February 2025
2. Joh, S.; Na, H.-K.; Son, J. G.; Lee, A. Y.; Ahn, C.-H.; Ji, D.-J.; Wi, J.-S.; Jeong, M. S.; Lee, S.-G.; Lee, T. G.; *ACS Nano* **2021**, *15*, 10141. [Crossref]
3. Wang, H.; Zhao, X.; Huang, Y.; Liao, J.; Liu, Y.; Pan, Y.; *Analyst* **2020**, *145*, 2168. [Crossref]
4. Andersen, W. C.; VanSickle, M.; Storey, J.; Sheldon, V.; Lohne, J.; Turnipseed, S. B.; Thomas, T.; Madson, M.; *Food Addit. Contam., Part A* **2019**, *36*, 1616. [Crossref]
5. Bořík, A.; Nováková, P.; Stroski, K. M.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2023**, e9517. [Crossref]
6. da Silva, C. T. A.; Lustosa A. I.; Kogawa, C. A.; *Curr. Pharm. Des.* **2023**, *29*, 1166. [Crossref]
7. Vervoort, N.; Goossens, K.; Baeten, M.; Chen, Q.; *Anal. Sci. Adv.* **2021**, *2*, 109. [Crossref]
8. Cantor, S. L.; Gupta, A.; Khan, M. A.; *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 539. [Crossref]
9. Kaya, S. I.; Cetinkaya, A.; Ozkan, S. A.; *Trends Environ. Anal. Chem.* **2022**, *33*, e00157. [Crossref]
10. Sinzervinch, A.; Torres, M. S. I.; Kogawa, C. A.; *Curr. Pharm. Des.* **2023**, *29*, 2442. [Crossref]

11. Branstetter, L.; Chatterjee, C.; Higgins, M. J.; *Res. Policy* **2022**, *51*, 104595. [Crossref]
12. Zhou, S.; Li, R.; Chen, Z.; Ren, R.; Wang, X.; Dai, Q.; Wen, D.; Guan, Y.; Zhang, X.; Tang, S.; Zhou, L.; Huang, M.; *Biomed. Chromatogr.* **2022**, *36*, e5393. [Crossref]
13. Miloshevska, D.; Roškar, R.; Vovk, T.; Lorber, B.; Grabnar, I.; Trontelj, J.; *Pharmaceuticals* **2024**, *17*, 449. [Crossref]
14. Shi, X.; Zhang, D.; Zhao, Z.; Mei, S.; *Bioanalysis* **2024**, *16*, 233. [Crossref]
15. Wong, J. M.; Jones, J. W.; Jiang, W.; Polli, J. E.; Kane, M. A.; *Ther. Drug Monit.* **2015**, *37*. [Crossref]
16. Hirano, L. Q. L.; de Oliveira, A. L. R.; de Barros, R. F.; Veloso, D. F. M. C.; Lima, E. M.; Santos, A. L. Q.; Moreno, J. C. D.; *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2024**, *47*, 427. [Crossref]
17. Heudi, O.; Barteau, S.; Picard, P.; Tremblay, P.; Picard, F.; Kretz, O.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 1088. [Crossref]
18. Dion-Fortier, A.; Gravel, A.; Guérette, C.; Chevillot, F.; Blais, S.; Auger, S.; Picard, P.; Segura, P. A.; *J. Mass Spectrom.* **2019**, *54*, 167. [Crossref]
19. Choi, H.; Lee, D.; Kim, Y.; Nguyen, H.-Q.; Han, S.; Kim, J.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2019**, *30*, 1174. [Crossref]
20. Springer, V.; Zhou, Y.; Aguilera, Á. Y.; Emmer, Å.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2024**, *416*, 861. [Crossref]
21. Luo, X.; Tue, P.-T.; Sugiyama, K.; Takamura, Y.; *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15170. [Crossref]
22. Badjagbo, K.; Sauv e, S.; *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5731. [Crossref]
23. Boisvert, M.; Fayad, P. B.; Sauv e, S.; *Anal. Chim. Acta* **2012**, *754*, 75. [Crossref]
24. Yao, J.; Scott, J. R.; Young, M. K.; Wilkins, C. L.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 805. [Crossref]
25. Peterson, D. S.; *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 19. [Crossref]
26. Sahasrabudde, A.; Oakley, D.; Chen, K.; McCarter, J. D.; *SLAS Discovery* **2021**, *26*, 230. [Crossref]
27. Lonappan, L.; Pulicharla, R.; Rouissi, T.; Brar, S. K.; Verma, M.; Surampalli, R. Y.; Valero, J. R.; *J. Chromatogr. A* **2016**, *1433*, 106. [Crossref]
28. Feist, P.; Hummon, A. B.; *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 3537. [Crossref]
29. Bynum, N. D.; Moore, K. N.; Grabenauer, M.; *J. Anal. Toxicol.* **2014**, *38*, 528. [Crossref]
30. Segura, P. A.; Guillaumain, C.; Eysseric, E.; Boudrias, J.; Moreau, M.; Gu erette, C.; Cl emencin, R.; Beaudry, F.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2022**, *36*, e9373. [Crossref]
31. Cohen, A. F.; Land, G. S.; Breimer, D. D.; Yuen, W. C.; Winton, C.; Peck, A. W.; *Clin. Pharmacol. Ther.* **1987**, *42*, 535. [Crossref]
32. Michail, K.; Daabees, H. M.; Beltagy, Y.; Abdel-Khalek, M.; Khamis, M. M.; *J. Chem.* **2013**, *2013*, 608196. [Crossref]
33. Peck, A. W.; *Epilepsia* **1991**, *32*, S9. [Crossref]
34. Costa, B.; Silva, I.; Oliveira, J. C.; Reguengo, H.; Vale, N.; *Sci. Pharm.* **2024**, *92*, 15. [Crossref]
35. *Analyst*, version 1.7.2; AB SCIEX, Framingham, MA, 2020.
36. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (US FDA); Center for Drug Evaluation and Research (CDER); *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*, <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>, accessed in February 2025.
37. Visconti, G.; Boccard, J.; Feinberg, M.; Rudaz, S.; *Anal. Chim. Acta* **2023**, *1240*, 340711. [Crossref]
38. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolu o da Diretoria Colegiada (RDC) No. 27, de 17 de maio de 2012, *Dispõe Sobre os Requisitos Mínimos para a Valida o de Métodos Bioanalíticos Empregados em Estudos Com Fins de Registro e Pós-Registro de Medicamentos*; Diário Oficial da União (DOU), Brasília, 2012. [Link] accessed in February 2025
39. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH); *ICH Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis*; https://database.ich.org/sites/default/files/M10_Guideline_Step4_2022_0524.pdf, accessed in February 2025.
40. Methaneethorn, J.; Leelakanok, N.; *Seizure* **2020**, *82*, 133. [Crossref]
41. Hotha, K. K.; Kumar, S. S.; Bharathi, D. V.; Venkateswarulu, V.; *Biomed. Chromatogr.* **2012**, *26*, 491. [Crossref]
42. Fang, L.; Li, Z.; Kinjo, M.; Lomonaco, S.; Zheng, N.; Jiang, W.; Zhao, L.; *Epilepsia* **2023**, *64*, 152. [Crossref]
43. Benedetti, N. I. G. M.; Veloso, D. F. M. C.; Nascimento, L. T.; Almeida Diniz, G. D.; Maione-Silva, L.; Lima, M. E.; *Curr. Pharm. Anal.* **2020**, *16*, 623. [Crossref]
44. *Phoenix WinNonlin*, version 6.4.0.768; Pharsight, Mountain View, CA, 2008.
45. Ghatol, S.; Vithlani, V.; Gurule, S.; Khuroo, A.; Monif, T.; Partani, P.; *J. Pharm. Anal.* **2013**, *3*, 75. [Crossref]
46. Kempka, M.; Sj dahl, J.; Bj rk, A.; Roeraade, J.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 1208. [Crossref]
47. Williams-Pavlantos, K.; Wesdemiotis, C.; *Adv. Sample Prep.* **2023**, *7*, 100088. [Crossref]
48. Tholey, A.; Heinzle, E.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 24. [Crossref]
49. Timofeeva, I.; Shishov, A.; Kanashina, D.; Dzema, D.; Bulatov, A.; *Talanta* **2017**, *167*, 761. [Crossref]
50. Lin, H.; Lin, L.; Xu, L.; Xie, Y.; Xia, Z.; Wu, Q.; *J. Tradit. Chin. Med. Sci.* **2018**, *5*, 291. [Crossref]
51. Liu, W.; Nie, H.; Liang, D.; Bai, Y.; Liu, H.; *Talanta* **2020**, *209*, 120357. [Crossref]
52. Li, M.; Wang, H.; Huan, X.; Cao, N.; Guan, H.; Zhang, H.; Cheng, X.; Wang, C.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, *413*, 5871. [Crossref]

53. Jogpethe, A.; Jadav, T.; Rajput, N.; Kumar Sahu, A.; Tekade, R. K.; Sengupta, P.; *Microchem. J.* **2022**, *179*, 107464. [Crossref]
54. Fjording, M. S.; Goodman, J.; Briscoe, C.; *Bioanalysis* **2024**, *17*, 1. [Crossref]
55. Ventura, S.; Rodrigues, M.; Pousinho, S.; Falcão, A.; Alves, G.; *Microchem. J.* **2017**, *130*, 221. [Crossref]
56. Castel-Branco, M. M.; Almeida, A. M.; Falcão, A. C.; Macedo, T. A.; Caramona, M. M.; Lopez, F. G.; *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **2001**, *755*, 119. [Crossref]
57. Rossen Koytchev, U. E.; *Arzneimittelforschung Drug Res.* **2011**, *58*, 255. [Crossref]
58. Daher, A.; Pinto, D. P.; da Fonseca, L. B.; Pereira, H. M.; da Silva, D. M. D.; da Silva, L. S. F. V.; Esteves, A. L.; Soares Medeiros, J. J.; Mendonça, J. S.; *Malaria J.* **2022**, *21*, 16. [Crossref]
59. Ju, G.; Yan, K.; Xu, Y.; Chen, S.; Zheng, Z.; Qiu, W.; *Drug Des. Devel. Ther.* **2020**, *14*, 2637. [Crossref]
60. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (US FDA); Center for Drug Evaluation and Research (CDER); *Bioequivalence Studies with Pharmacokinetic Endpoints for Drugs Submitted Under an ANDA Guidance for Industry*, <https://www.fda.gov/media/87219/download> accessed in February 2025.
61. Garnett, W. R.; *J. Child Neurol.* **1997**, *12*, S10. [Crossref]
62. Ramsay, R. E.; Pellock, J. M.; Garnett, W. R.; Sanchez, R. M.; Valakas, A. M.; Wargin, W. A.; Lai, A. A.; Hubbell, J.; Chern, W. H.; Allsup, T.; Otto, V.; *Epilepsy Res.* **1991**, *10*, 191. [Crossref]

Submitted: January 31, 2025

Published online: March 11, 2025