



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Filipa Fontoura Diogo Henriques de Gouveia

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Liquid chromatographic methods for the determination of direct oral anticoagulant drugs in biological samples: A critical review” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ana Isabel Rebelo, Dra. Rita Isabel Neves e da Professora Doutora Ana Cristina Fortuna apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Filipa Fontoura Diogo Henriques de Gouveia

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Liquid chromatographic methods for the determination of direct oral anticoagulant drugs in biological samples: A critical review” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dra. Ana Isabel Rebelo, Dra. Rita Isabel Neves e da Professora Doutora Ana Cristina Fortuna apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2019

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Eu, Filipa Fontoura Diogo Henriques de Gouveia, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013136105, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Liquid chromatographic methods for the determination of direct oral anticoagulant drugs in biological samples: A critical review” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 4 de setembro de 2019.

Filipa Gouveia

(Filipa Fontoura Diogo Henriques de Gouveia)

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Ana Cristina Fortuna, pelo constante apoio que sempre me deu ao longo desta etapa. Na verdade, desde que iniciei o meu estágio no laboratório de farmacologia, sempre fez tudo para me ajudar a alcançar os meus objetivos. Sempre com muito carinho e dedicação, nunca irei esquecer tudo aquilo que fez por mim. A sua dedicação foi excepcional e não poderia estar mais agradecida por tudo o que me ensinou ao longo deste percurso.

A toda a equipa da Farmácia Estádio por terem tornado esta experiência tão enriquecedora, pelo apoio que sempre prestaram e pela simpatia com que me acolheram. Foi uma experiência que marcou sem dúvida o meu percurso académico.

A toda a equipa do Departamento Médico da Tecnimede pelos conhecimentos transmitidos e por toda a simpatia e paciência que tiveram comigo no decorrer do estágio.

Aos meus amigos que sempre estiveram lá em todos os momentos para me apoiar e para tornar este percurso mais divertido. Muitas saudades irão ficar destes tempos.

À minha família que sempre foi o meu principal apoio em todos os momentos mais importantes da minha vida, sem eles nada disto era possível. Um obrigado muito especial.

# Índice

## Relatório de Estágio Farmácia Comunitária

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	9
<b>1. Introdução</b> .....	10
<b>2. Contextualização</b> .....	11
<b>3. Análise SWOT</b> .....	12
<b>a. Pontos Fortes</b> .....	12
i. Organização do Estágio Curricular .....	12
ii. Localização da Farmácia e heterogeneidade de utentes .....	13
iii. Preparação individualizada da medicação (PIM) .....	13
<b>b. Pontos Fracos</b> .....	14
i. Lacunas em algumas áreas do aconselhamento .....	14
ii. Fase inicial do atendimento ao público .....	14
iii. Nomes comerciais do medicamento .....	15
<b>c. Oportunidades</b> .....	15
i. Participação em formações .....	15
ii. Instalação Robot .....	16
iii. Introdução novo SIFARMA® .....	16
iv. Realização de palestras em escolas .....	17
<b>d. Ameaças</b> .....	17
i. Medicamentos esgotados .....	17
ii. Publicidade .....	18
iii. Desconfiança dos utentes relativamente ao atendimento do estagiário .....	18
iv. Receitas manuais .....	19
<b>4. Caso Clínico</b> .....	19
<b>5. Considerações Finais</b> .....	20
<b>6. Referências</b> .....	21

## **Relatório de Estágio Indústria**

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	23
<b>1. Introdução</b> .....	24
<b>2. Enquadramento</b> .....	25
<b>3. Análise SWOT</b> .....	26
<b>a. Pontos Fortes</b> .....	26
i. Organização do estágio .....	26
ii. Ensaio de bioequivalência .....	27
iii. Conhecimento adquirido com a leitura de guidelines e legislação aplicável .....	28
iv. Contacto com várias fases de um EC .....	28
v. Apoio prestado pela equipa .....	31
<b>b. Pontos Fracos</b> .....	32
i. Duração do estágio .....	32
ii. Lacunas no programa curricular do MICF .....	32
<b>c. Oportunidades</b> .....	33
i. Apresentação oral para o DMED .....	33
ii. Formação com várias áreas do DMED .....	33
<b>d. Ameaças</b> .....	34
i. Produtos de referência com formulações mais complexas e novos enquadramentos regulamentares .....	34
<b>4. Considerações Finais</b> .....	35
<b>5. Referências</b> .....	36

## **Liquid chromatographic methods for the determination of direct oral anticoagulant drugs in biological samples: A critical review**

<b>Abstract</b> .....	38
<b>Abbreviations</b> .....	40
<b>1. Introduction</b> .....	42

<b>2. Physicochemical properties and stock solutions of DOACs</b> .....	44
<b>3. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties</b> .....	47
a) Dabigatran.....	50
b) Rivaroxaban .....	51
c) Apixaban .....	53
d) Edoxaban .....	54
e) Betrixaban.....	55
<b>4. Chromatographic methods for the determination of DOACs</b> .....	56
a) Sample preparation.....	57
b) Stability and storage of DOACs .....	61
c) Chromatographic conditions.....	63
I) Internal standard.....	63
II) Chromatographic column .....	64
III) Mobile phase.....	65
d) Detection mode .....	65
<b>5. Conclusion</b> .....	67
<b>References</b> .....	68
<b>Annexes</b> .....	79

**Parte I.**  
**Relatório de Estágio Farmácia Comunitária**



## Lista de Abreviaturas

**ANF:** Associação Nacional das Farmácias

**DCI:** Denominação Comum Internacional

**ECA:** Enzima de conversão da angiotensina

**MICF:** Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**SWOT:** *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

## I. Introdução

No âmbito do plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) é obrigatório a realização de um estágio em Farmácia Comunitária. Do meu ponto de vista, este estágio é fundamental para consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso. De facto, durante 5 anos são-nos fornecidas bases teóricas que devem ser posteriormente aprofundadas, o que só é possível com uma formação mais prática.

O farmacêutico comunitário, não sendo apenas um especialista do medicamento como também um prestador de cuidados de saúde, que está diariamente em contacto com a população, é cada vez mais preponderante na diminuição da sobrecarga dos hospitais, uma vez que tem a possibilidade de evitar deslocações desnecessárias em caso de transtornos menores [1].

Atualmente, o leque de atividades desenvolvidas por um farmacêutico comunitário é muito amplo, o que se deve em grande parte ao local de destaque que este ocupa junto das populações. Na verdade, nas farmácias para além da gestão da terapêutica e do aconselhamento farmacêutico, é também realizada a determinação de parâmetros bioquímicos, a promoção de um estilo de vida saudável, a preparação individualizada da medicação, entre outros. Como tal, o estudante do MICF, encontra neste estágio, uma excelente oportunidade para explorar diversas áreas e adquirir a experiência necessária para posteriormente singrar no meio laboral.

O meu estágio teve a duração de aproximadamente 4 meses, tendo iniciado em janeiro e terminado no final de abril. Durante estes 4 meses tive a oportunidade de colocar em prática todos os conhecimentos adquiridos ao longo do curso bem como de adquirir novas ferramentas úteis no dia-a-dia de um farmacêutico. Efetivamente, este estágio consistiu no meu primeiro contacto com a realidade atual do sector farmacêutico, o que permitiu, deste modo, desenvolver novas competências que acredito que serão de primordial importância num futuro próximo.

O presente relatório reflete sobre o estágio curricular realizado na Farmácia Estádio em Coimbra, sob a orientação da Dra. Ana Isabel Rebelo. Este será organizado com base numa análise *SWOT*, onde destaco os pontos fracos, os pontos fortes, as ameaças e as oportunidades decorrentes do respetivo estágio.

## 2. Contextualização

A Farmácia Estádio localizada no Estádio Cidade de Coimbra, na Rua D. João III, nº 11, é propriedade da Dra. Ana Isabel Rebelo, que assume também o papel de Diretora Técnica da Farmácia. Esta é uma farmácia moderna, com uma equipa jovem, tendo sempre em vista uma melhoria contínua.

### Contextualização da Farmácia Estádio

Localização	Rua D. João III, nº 11, 3030-349, Coimbra
Horário	8h30-21h (segunda-feira a sexta-feira) 9h-19h (sábados)
Proprietário	Dra. Ana Isabel Rebelo
Direção Técnica	Dra. Ana Isabel Rebelo
Farmacêutico Substituto	Dr. André Paiva
Farmacêuticos	Dra. Joana Grangeia Dr. Luís Cavaleiro Dra. Mónica Gomes
Técnicos Auxiliares de Farmácia	Dina Rodrigues Maria Edite Dinis Hugo Travassos
Contabilidade	Dra. Maria João Domingues Dra. Carolina Cordeiro
Nutricionista	Dra. Telma Amado
Podologista	Dra. Susana Dias

### **3. Análise SWOT**

#### **a. Pontos Fortes**

##### **i. Organização do Estágio Curricular**

A Farmácia Estádio localizada no centro da cidade de Coimbra, tem por hábito acolher estudantes do MICE, proporcionando-lhes um estágio que, a meu ver, está consideravelmente bem organizado e com etapas claramente definidas. Deste modo, numa primeira fase o estágio inicia pela receção de encomendas e gestão de produtos. Esta fase inicial permite um contacto precoce com o *stock* de medicamentos da farmácia, oferecendo-nos a possibilidade de nos familiarizarmos com os medicamentos dispensados bem como com o sistema de gestão do medicamento, o SIFARMA 2000<sup>®</sup>. Efetivamente, considero que esta etapa nos torna mais aptos a desempenhar adequadamente as fases posteriores do estágio.

Simultaneamente, todos os estagiários têm uma formação de carácter obrigatório onde aprendem a determinar parâmetros bioquímicos e antropométricos. Na verdade, uma vez que a farmácia disponibiliza à população a possibilidade de fazer a determinação da pressão arterial, glicémia, colesterol e triglicéridos, é fundamental que o estagiário esteja habilitado a desempenhar estas tarefas. Deste modo, nesta formação aprendemos a utilizar os aparelhos de medição e a interpretar os resultados, correlacionando-os com o quadro clínico do doente em questão. Esta aprendizagem é imprescindível uma vez que, a medição destes parâmetros constitui uma ferramenta valiosa para promover a adesão à terapêutica e avaliar a sua eficácia.

Cerca de um mês depois do início do estágio, começámos a observar atendimentos ao público e a aprender a utilizar o SIFARMA 2000<sup>®</sup> nos atendimentos. Este foi, portanto, o primeiro contacto que tive com o balcão. Nesta etapa, aprendi a adequar a minha postura e linguagem ao atendimento ao balcão, adquiri técnicas úteis para o aconselhamento farmacêutico e ainda comecei a aprender a utilizar o SIFARMA 2000<sup>®</sup> de forma autónoma.

Por fim, depois de estar devidamente habilitada a realizar atendimentos ao público de forma autónoma comecei a ir para o balcão sozinha. Esta etapa foi bem-sucedida devido, sobretudo, ao auxílio prestado por todos os membros da farmácia Estádio que sempre se mostraram disponíveis para ajudar em todos os momentos em que senti mais dificuldades.

Esta organização sequencial do estágio permite que o estagiário ganhe, gradualmente, mais responsabilidades e que tire o máximo proveito de todos os serviços prestados na farmácia.

## **ii. Localização da Farmácia e heterogeneidade de utentes**

A Farmácia Estádio encontra-se numa zona privilegiada da cidade uma vez que se encontra rodeada de diversas infraestruturas, tais como: escolas, clínicas privadas, centros comerciais e habitações. Assim sendo, depara-se diariamente com uma grande panóplia de utentes. É, por isso, possível fazer uma clara distinção entre clientes habituais e clientes esporádicos. De facto, uma vez que se trata de uma zona habitacional tem uma população mais idosa, que frequenta habitualmente a farmácia, para a qual é possível fornecer um atendimento mais personalizado. Por outro lado, tem também um conjunto de utentes que se desloca à farmácia após consulta numa das clínicas na vizinhança, com intuito, única e exclusivamente, de aviar receitas prescritas nas consultas.

Esta heterogeneidade de utentes é um desafio uma vez que é preciso saber avaliar cada situação em particular, mediante a informação que nos é disponibilizada e ainda adequar o discurso face aos diferentes tipos de utentes e às diferentes faixas etárias.

## **iii. Preparação individualizada da medicação (PIM)**

Para além das atividades realizadas no espaço físico da farmácia tive ainda a oportunidade de prepara a medicação de alguns idosos residentes numa instituição de saúde de apoio à terceira idade. A Farmácia Estádio apenas iniciou a prestação deste tipo serviços este ano.

A preparação individualizada da medicação consiste em colocar o medicamento correto, na dose correta, na hora correta, para o doente correto. Sendo que nesta unidade, existiam cerca de 60 doentes, esta foi uma tarefa exigente que requereu uma atenção adicional, visto que qualquer erro na medicação (omissão, duplicação ou confusão), podia ter um impacto negativo na saúde do utente. Para além disso, tendo em conta que esta é uma população polimedicada, a probabilidade de ocorrência de interações medicamentosas é maior pelo que, cabe também ao farmacêutico analisar as potências interações

medicamentosas e debater com outros profissionais de saúde alternativas terapêuticas no caso de ser necessário.

## **b. Pontos Fracos**

### **i. Lacunas em algumas áreas do aconselhamento**

Uma das principais dificuldades que verifiquei no decorrer do estágio foi a dificuldade no aconselhamento farmacêutico em algumas áreas, nomeadamente no que diz respeito aos produtos de uso veterinário, aos cosméticos e aos medicamentos homeopáticos.

No plano de estudos do MICF temos uma cadeira de produtos de uso veterinário e uma de dermofarmácia e cosmética, no entanto, a meu ver estas não exploram tanto a componente do aconselhamento farmacêutico ficando aquém do que realmente se passa na farmácia. Deste modo, senti que não estava devidamente preparada para este tipo de aconselhamento bem como no de medicamentos homeopáticos que não é âmbito do plano curricular do MICF. No entanto, durante o estágio foi possível participar em formações com várias marcas de cosméticos de venda em farmácia, com produtos homeopáticos e com medicamentos de uso veterinário, o que permitiu ultrapassar algumas das dificuldades sentidas numa fase inicial do estágio. Para além disso, os colegas da farmácia sempre se mostraram disponíveis para nos prestar esclarecimentos nas várias áreas em que sentíamos mais dificuldades.

### **ii. Fase inicial do atendimento ao público**

O início do atendimento ao público foi, de maneira geral, uma das fases mais difíceis do meu estágio. Na verdade, o curso de Ciências Farmacêuticas tem uma componente teórica muito desenvolvida que nos fornece bases essenciais para poder prestar um aconselhamento farmacêutico correto e adaptado a cada situação, no entanto, os conhecimentos adquiridos só são postos em prática no balcão. Deste modo, quando chegamos à farmácia sentimos uma insegurança inicial relativamente ao aconselhamento prestado e por isso muitas vezes é necessário recorrer ao auxílio da restante equipa.

Adicionalmente, o contacto com o público nem sempre é fácil, sendo necessário adquirir ferramentas para aprender a lidar com as várias situações às quais somos exposto

diariamente, o que inicialmente foi uma preocupação que senti. No entanto, considero que com o decorrer do tempo fui ganhando mais confiança no meu aconselhamento, tendo deste modo conseguido ultrapassar as dificuldades inicialmente apresentadas.

### **iii. Nomes comerciais do medicamento**

Como estudantes, estamos frequentemente habituados a designar os medicamentos pela sua Designação Comum Internacional (DCI). No entanto, quando chegamos à Farmácia a realidade é um bocado diferente, sendo que é comum o utente solicitar o medicamento referindo-se ao seu nome comercial e não à sua DCI. Este facto foi, por vezes, uma adversidade visto que gerava alguns problemas na comunicação com o utente. No entanto, penso que este obstáculo foi progressivamente removido à medida que fui realizando mais atendimentos e sobretudo com a experiência que ganhei a preparar a medicação individualizada para os utentes, o que me levou a contactar mais diretamente com os medicamentos, facilitando assim a associação entre o nome comercial e a DCI.

### **c. Oportunidades**

#### **i. Participação em formações**

Durante o estágio na farmácia comunitária temos a possibilidade de participar em formações em diferentes áreas, o que permite cimentar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso. Estas formações são uma mais-valia uma vez que, para além de contribuírem para uma aprendizagem contínua, permitem também adquirir estratégias para a comercialização dos vários produtos. Das várias formações que tive a oportunidade de participar, destaco a formação sobre produtos homeopáticos. Na verdade nunca tinha contactado com este tipo de medicamentos, uma vez que não é âmbito do plano de estudos do MICF e, como tal, rapidamente senti a necessidade de melhorar os meus conhecimentos nesta área uma vez que são medicamentos muito dispensados na Farmácia Estádio, dado que esta se encontra próximo de uma clínica de homeopatia. Também as formações com as diferentes marcas de produtos cosméticos foram extremamente úteis, na medida em que permitiram um conhecimento mais aprofundado das gamas disponibilizadas pelas várias linhas de cosmética comercializadas na farmácia.

## ii. Instalação Robot

Quando iniciei o estágio, a Farmácia Estádio não possuía *Robot* de dispensa de medicamentos, o que me permitiu contactar mais de perto com os medicamentos, uma vez que era responsável pelo seu armazenamento e pela gestão dos seus *stocks*. Contudo, a meio do meu estágio a farmácia adquiriu um *Robot* de dispensa. Com a instalação do novo sistema, toda a equipa teve uma formação obrigatória com os responsáveis pelo aparelho, em que foi explicado, pormenorizadamente, o funcionamento do *robot* bem como as medidas a adotar no caso de falha do sistema.

O *robot* permite não só gerir *stocks* e armazenar medicamentos como também dispensar medicamentos, o que facilita muito o trabalho do farmacêutico. Na verdade, uma vez que o farmacêutico deixa de ter de procurar os medicamentos manualmente, tem mais tempo para se dedicar ao aconselhamento farmacêutico e para contactar com o utente.

O facto de ter tido a possibilidade de acompanhar todo este processo foi uma grande oportunidade para conseguir adaptar-me facilmente a diferentes tipos de farmácias, com diferentes sistemas.

## iii. Introdução novo SIFARMA®

Durante o estágio, tive oportunidade de trabalhar com o SIFARMA 2000® e com o novo módulo de atendimento do SIFARMA®. Inicialmente comecei por utilizar o SIFARMA 2000®, este sistema não é muito intuitivo e por isso numa fase inicial senti algumas dificuldades em adaptar-me, no entanto, depois de algum treino, consegui facilmente desempenhar todas as tarefas que o sistema me permitia. Apesar de ter usado mais regularmente o sistema antigo, uma vez que o novo ainda está em fase piloto, também pude realizar algumas tarefas no novo SIFARMA®. O novo SIFARMA®, contrariamente ao SIFARMA 2000®, tem uma configuração muito mais simples e intuitiva, facilitando assim a sua utilização. Deste modo, considero que fiquei inteiramente capacitada a funcionar com os dois sistemas operativos.



#### **iv. Realização de palestras em escolas**

Uma das atividades que tive a oportunidade de realizar durante o meu estágio foi a de participar na dinamização de palestras em escolas primárias com o tema “Mais piolhos não”. Estas palestras promovidas pela Farmácia Estádio tinham como objetivo sensibilizar as populações mais jovens para a problemática dos piolhos.

Sendo o ato farmacêutico muito mais do que estar ao balcão a dispensar medicamentos, penso que a oportunidade de me ter envolvido neste projeto me permitiu desenvolver outras competências fundamentais do farmacêutico. A saúde pública é, de facto, de primordial importância e como tal, acho essencial que a farmácia se envolva na promoção da saúde através da divulgação de informação.

#### **d. Ameaças**

##### **i. Medicamentos esgotados**

Atualmente, o número de medicamentos esgotados tem vindo a aumentar exponencialmente. De facto, durante o meu estágio, foram várias as vezes em que não pude dispensar ao utente o medicamento solicitado, porque este se encontrava esgotado no laboratório. Todavia, notei que foram feitos alguns esforços para combater este problema. Por essa razão, a Associação Nacional das Farmácias (ANF) promoveu uma petição pública à Assembleia da República intitulada ‘Salvar as Farmácias’ que tinha como um dos seus pilares combater as falhas de medicamentos [2]. Para além disso, na plataforma SIFARMA 2000® foram disponibilizados inquéritos que apareciam de forma aleatória nos atendimentos e que tinham como objetivo avaliar o impacto da escassez dos medicamentos.

Apesar da crescente consciencialização do problema dos medicamentos esgotados e da tentativa de o solucionar, esta questão está longe de ser resolvida sendo de primordial importância tomar medidas mais severas de modo a permitir à população o acesso equitativo à medicação.

## **ii. Publicidade**

A sociedade atual adota um estilo de vida orientado por uma crescente tendência ao consumo de bens e serviços, particularmente associados aos meios de comunicação e à publicidade. A farmácia não escapa a esta realidade, sendo que os produtos nela dispensados bem como os serviços prestados são fortemente publicitados nos vários meios de comunicação. Este fator, combinado com o aumento da informação disponibilizada nas plataformas eletrónicas contribui para um aumento da automedicação. Assim sendo, muitas vezes o utente, em vez de se dirigir à farmácia para solicitar aconselhamento farmacêutico, procura única e exclusivamente adquirir o medicamento que julga ser adequado à sua condição, mediante a informação que adquiriu nos meios de comunicação e nas plataformas eletrónicas. Não obstante, cabe ao farmacêutica tentar avaliar a situação clínica do utente, garantindo a adequação do medicamento solicitado e em caso de uma alternativa terapêutica melhor, fazer o devido esclarecimento ao utente de modo a que este possa tomar uma decisão informada.

## **iii. Desconfiança dos utentes relativamente ao atendimento do estagiário**

Na farmácia estádio os estagiários encontram-se devidamente identificados com uma bata verde que os distingue dos restantes membros da equipa. Por um lado, esta abordagem é positiva uma vez que alerta os utentes para o facto de que ainda estamos numa fase de aprendizagem, funcionando como mecanismo de defesa em situações de maior dificuldade. Por outro lado, esta estratégia pode ter um efeito contrário, como por exemplo, houve casos em que os utentes não quiseram ser atendidos por nós por termos batas verdes e por não se sentirem seguros quanto às tarefas por nós desempenhadas. Contudo, destaco que a equipa da Farmácia Estádio teve um papel muito importante na nossa integração junto dos utentes da farmácia uma vez que sempre se mostrou disponível para falar com as pessoas que se sentiam pouco confiantes com o nosso atendimento no sentido de as tranquilizar e assegurar a nossa aptidão para desempenhar as tarefas propostas, pondo-se sempre à disposição para auxiliar nas várias etapas do atendimento.

#### **iv. Receitas manuais**

No decorrer do estágio contactei com dois tipos de receitas, as receitas manuais e as receitas eletrónicas. As receitas eletrónicas são simples de dispensar e dão azo a menos erros, uma vez que não estão sujeitas à interpretação da caligrafia do médico. Já as receitas manuais, são muito mais suscetíveis a interpretações erradas visto que, por vezes, a caligrafia não é perfeitamente legível, podendo levar a erros na dispensa. Assim sendo, tendo em conta as vantagens associadas às receitas eletrónicas, é do interesse dos farmacêuticos que este tipo de receitas seja adotado permanentemente em detrimento das manuais, de modo a que não haja condicionamentos na dispensa de medicamentos ao utente.

#### **4. Caso Clínico**

Um senhor na casa dos 50 anos dirige-se à Farmácia Estádio queixando-se de tosse seca sobretudo durante a noite, que já se prolonga há pelo menos um mês. Com o intuito de perceber qual o motivo desta tosse perguntei ao senhor se estava a tomar alguma medicação, ao que o senhor me respondeu que, para além da medicação para a diabetes, estava também a tomar um medicamento para o tratamento da tensão arterial, nomeadamente, um inibidor da enzima de conversão da angiotensina (ECA). Este fármaco atua inibindo a conversão da angiotensina I (inativa) em angiotensina II (ativa), contribuindo para a diminuição da pressão arterial [3]. No entanto, como efeito secundário pode também inibir uma enzima análoga da ECA localizada nos pulmões que é responsável pela degradação da bradicinina [3]. O conseqüente aumento da concentração de bradicinina nos pulmões contribui para o sintoma de tosse referido pelo utente [3,4]. Este sintoma de tosse desaparece rapidamente após suspensão do tratamento com o inibidor da ECA [3,4]. Assim sendo, aconselhei o utente a consultar o seu médico cardiologista de modo a que este possa avaliar a situação e proceder à alteração do medicamento em questão.

## 5. Considerações Finais

Refletindo sobre os 4 meses em que estagiei na Farmácia Estádio, apercebo-me de que o meu crescimento nesta farmácia não foi apenas a nível científico e profissional mas também a nível pessoal. O facto de um farmacêutico comunitário poder conviver diariamente com o utente, permite que este contacte com diferentes realidades, permitindo compreender o mundo de outra maneira, de outros pontos de vista.

O farmacêutico comunitário tem, cada vez mais, um papel fulcral junto da população, muito mais preponderante do que a simples dispensa de medicamentos ao qual é vulgarmente associado. O farmacêutico é o ponto de ligação entre a população e os outros profissionais de saúde, é um prestador de serviços de saúde, é responsável pela educação para a saúde e pela promoção de um estilo de vida saudável.

Foi com um enorme prazer que desfrutei desta experiência, que foi sem dúvida essencial para a minha aprendizagem. Apesar das dificuldades sentidas numa fase inicial, penso que estas foram superadas. Para além de ter cimentado os conhecimentos adquiridos ao longo do curso, tive também a oportunidade de enriquecer os meus conhecimentos e contactar com áreas com as quais não estava habituada a contactar.

Por último, não poderia deixar de agradecer a toda a equipa da Farmácia Estádio que sempre se mostrou disponível para me ajudar durante o meu estágio e que contribuiu para que esta experiência fosse tão enriquecedora. Tenho a certeza que, quer o meu futuro passe pela farmácia comunitária ou não, os ensinamentos que levo deste estágio, serão extremamente úteis para iniciar a vida de trabalho com excelência e profissionalismo.

## 6. Referências

[1]. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **A Farmácia Comunitária**. [Consultado a 22 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>

[2]. ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS FARMÁCIAS – **Salvar as Farmácias, Cumprir o SNS**. [Consultado a 22 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.salvarasfarmacias.pt/>

[3]. GOODMAN & GILMAN'S – **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9<sup>th</sup> Edition. United States, 1996. ISBN 0-07-113348-8.

[4]. INFARMED – **Resumo das Características do Medicamento Capoten®**.

[Consultado a 26 de agosto de 2019]. Disponível em :

[http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=1434&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=1434&tipo_doc=rcm)

**Parte II.**  
**Relatório de Estágio Indústria**

## Lista de Abreviaturas

**AIM:** Autorização Introdução no mercado

**API:** Active Pharmaceutical Ingredient

**AUC<sub>0-t</sub>:** Área sob a curva

**Cmax:** Concentração Máxima

**CQQ:** Composição quantitativa/qualitativa

**CRA:** *Clinical Research Associate*

**CTA:** Clinical Trial Application

**CTD:** Common Technical Document

**CTPM:** Clinical Trial Project Manager

**DMED:** Departamento Médico

**EC:** Ensaios Clínicos

**EMA:** European Medicines Agency

**FDA:** U.S Food and Drug Administration

**GCP:** Good Clinical Practice

**GMP:** Good Manufacturing Practices

**GPP:** Good Pharmacoepidemiology Practice

**MICF:** Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**PL:** Project Leader

**SPC:** Summary of Products Characteristics

**TSE/BSE:** Transmissible Spongiform Encephalopathies/Bovine Spongiform Encephalopathies

## I. Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Universidade de Coimbra proporciona aos seus alunos a possibilidade de realizarem um estágio numa área de interesse, para além da realização de um estágio em Farmácia Comunitária, permitindo deste modo que estes comecem a ganhar alguma experiência em áreas onde poderão, mais tarde, vir a desenvolver a sua atividade profissional. Como tal, esta oportunidade é uma mais valia para o aluno, uma vez que contribui não só para o seu desenvolvimento profissional como também pessoal.

A área das Ciências Farmacêuticas disponibiliza aos seus profissionais uma panóplia de alternativas laborais, maioritariamente focadas no medicamento. Deste modo, um profissional desta área pode trabalhar tanto na investigação e desenvolvimento de um medicamento, como também na sua produção, controlo de qualidade, introdução no mercado e comercialização.

A Indústria Farmacêutica é um sector de relevo dentro da área das Ciências Farmacêuticas uma vez que se ocupa de uma grande parte do percurso do medicamento. De facto, de acordo com a Ordem dos Farmacêuticos, a Indústria Farmacêutica “...envolve várias fases, que vão desde a pesquisa microscópica à produção em massa. Em todo este processo, a supervisão farmacêutica assegura o conhecimento técnico-científico e o respeito pelas boas práticas de fabrico”[1]. Assim sendo, acredito ser de extrema importância, para um profissional da área das ciências farmacêuticas, contactar com esta realidade durante a sua formação académica.

Deste modo, com o objetivo de alargar horizontes e melhorar o meu conhecimento dentro das várias áreas do sector farmacêutico, decidi abraçar um novo desafio e participar num estágio no contexto da Indústria Farmacêutica.

O presente relatório tem como finalidade descrever o estágio curricular promovido pelo Grupo Tecnimede em Sintra, na área dos Ensaios Clínicos, orientado pela Dra. Rita Neves, com a duração de três meses (maio a julho).

Este relatório será organizado com base numa análise SWOT, onde destaco os pontos fracos, os pontos fortes, as ameaças e as oportunidades decorrentes do respetivo estágio.



## 2. Enquadramento

O Grupo Tecnimedé iniciou a sua atividade em 1980 e é constituído por empresas farmacêuticas com capital privado e 100% português. A estratégia do GRUPO TECNIMEDE assenta num forte investimento na Investigação, Desenvolvimento e Produção de Medicamentos. As atividades desempenhadas pelo grupo abrangem todo o ciclo de vida do medicamento para uso humano desde o seu desenvolvimento, produção até à promoção e comercialização [2].

O Grupo Tecnimedé, apesar de inicialmente se ter fixado exclusivamente em Portugal, tem vindo a reforçar a exportação e internacionalização dos produtos desenvolvidos internamente. Um exemplo da crescente expansão do Grupo Tecnimedé noutros continentes é a Atlanticpharma (Brasil) e a Atlas Pharma (Marrocos); para além dos mais de 40 países com os quais tem parcerias, permitindo assim a exportação de medicamentos para o estrangeiro [3]. As cinco filiais do grupo, presentes em Espanha, Itália, Marrocos, Colômbia e Brasil demonstram bem o seu crescimento como empresa multinacional [4].

Mais especificamente, o Departamento Médico (DMED) da Tecnimedé, onde tive a oportunidade de realizar o meu estágio, engloba várias áreas distintas, nomeadamente os Projetos de Desenvolvimento (ensaios clínicos e não clínicos), a Farmacovigilância, a Compliance/Scientific Affairs e a Garantia de Qualidade.

## Contextualização da área dos Projetos de Desenvolvimento (Ensaio clínicos) do DMED

Medical Director		Dr. Augusto Filipe
Administrative Assistant		Liliana Coelho
Ensaio Clínicos	Project Leader (PL)	Rita Neves
	Clinical Trial Assistant	Susana Gradiz
	Clinical Research Associate (CRA)	Joana Costa Sara Santos
	Clinical Trial Project Manager (CTPM)	Tiago Torcato
	Data Manager & Statistical Analyst Associate	Sónia Pinto

### 3. Análise SWOT

#### a. Pontos Fortes

##### i. Organização do estágio

No início do estágio, tive a oportunidade de ter uma breve formação, efetuada pelo departamento de recursos humanos, onde foi feita uma contextualização da empresa e nos foi dado a conhecer o regulamento da Tecnimede. Mais tarde, tivemos ainda a oportunidade de realizar uma visita às instalações da fábrica. Esta integração inicial foi muito importante dado que permitiu, não só conhecer melhor a empresa e as suas instalações, como também perceber os objetivos e a missão da empresa. De facto, é fundamental para uma pessoa que está a iniciar o trabalho numa nova empresa, conhecer claramente a missão e os valores desta, de modo a desempenhar o seu trabalho de acordo com os objetivos propostos.

No meu primeiro dia no DMED, recebi um calendário onde discriminava todas as atividades a desenvolver nas semanas iniciais do estágio. Estas atividades eram essencialmente de carácter formativo e incluíam a leitura de documentos chave na área dos Ensaio Clínicos (EC) e a participação em ações de formação promovidas por vários elementos do DMED. Esta etapa inicial foi essencial uma vez que me permitiu colmatar algumas lacunas existentes

na área dos EC, bem como adquirir competências básicas para o desempenho das funções inerentes ao cargo de Clinical Research Associate (CRA) trainee, o qual teve oportunidade de desempenhar durante estes três meses.

## ii. Ensaio de bioequivalência

Dado que, no Grupo Tecnimede se procede, essencialmente, à introdução no mercado de medicamentos genéricos e tendo em conta que de acordo com o Estatuto do Medicamento, um medicamento genérico é definido como um “medicamento com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica e cuja bioequivalência com o medicamento de referência haja sido demonstrada por estudos de biodisponibilidade apropriados” [5], a maioria dos EC realizados pelo DMED são de biodisponibilidade/bioequivalência. Estes ensaios têm como principal objetivo demonstrar que o medicamento teste (potencial medicamento genérico) é equivalente ao medicamento de referência (o inovador) e não o de demonstrar a sua eficácia e/ou segurança, uma vez que estas já foram previamente comprovadas para o medicamento de referência. Deste modo, os estudos de biodisponibilidade/bioequivalência avaliam os processos que influenciam a biodisponibilidade de um fármaco, ou seja, os processos que afetam a velocidade e extensão a que uma substância ativa é absorvida de uma forma farmacêutica e se torna disponível no seu local de ação, e conseqüentemente, na corrente sanguínea no caso de fármacos de absorção sistémica. A bioequivalência é inferida com base na determinação da Concentração Máxima ( $C_{max}$ ) e da Área sob a Curva ( $AUC_{0-t}$ ), que são os principais endpoints deste tipo de estudos [6].

Podemos assim concluir que os ensaios realizados em inovadores e em genéricos são muito distintos, tendo em conta que uns têm como objetivo avaliar a eficácia e a segurança das substâncias ativas em estudo e outros os perfis e características farmacocinéticos das formulações em estudo. Os ensaios de bioequivalência são fortemente regulamentados uma vez que para além da legislação aplicável aos EC no geral, têm também de obedecer à legislação específica para os ensaios de bioequivalência, o que assegura a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos genéricos desenvolvidos [6,7].

Efetivamente, o mercado de genéricos é uma realidade que se encontra em crescimento e como tal, considero ter sido uma excelente oportunidade poder contactar com os ensaios requeridos para a introdução deste tipo de medicamentos no mercado.

### **iii. Conhecimento adquirido com a leitura de *guidelines* e legislação aplicável**

Como referi anteriormente, na minha formação inicial do estágio tive a oportunidade de ler várias *guidelines* e a legislação aplicável aos EC. Na verdade, estes documentos são a base para todo o trabalho desenvolvido por qualquer elemento de uma equipa que trabalhe em EC, sendo essencial para o correto desempenho das funções de um CRA, como tal considero que foi imprescindível para o meu estágio o contacto com estes documentos, uma vez que estes foram uma ferramenta essencial em todas as tarefas que tive a oportunidade de desempenhar. Para além disso, penso que os conhecimentos adquiridos são fundamentais não só para a área dos EC como também para todas as áreas da indústria farmacêutica. Na verdade, para além da leitura de variadíssimos documentos inerentes aos EC, destaco a leitura das boas práticas de distribuição, as boas práticas de fabrico, a lei nacional dos ensaios clínicos e o respetivo regulamento Europeu e ainda o estatuto do medicamento que são documentos transversais a várias áreas da indústria farmacêutica [5,8,9].

### **iv. Contacto com várias fases de um EC**

Dado que os ensaios de biodisponibilidade/bioequivalência geralmente consistem na administração única e cruzada do medicamento teste e do medicamento de referência a um mesmo grupo de indivíduos saudáveis, em duas sequências, sendo apenas necessários dois períodos de tratamento separados por um período de *wash-out*, a duração destes é bastante inferior (meses) à dos ensaios de fase II e III, que chegam a demorar alguns anos. Como tal, durante o meu estágio tive a oportunidade de contactar com vários ensaios em diferentes etapas do seu desenvolvimento, o que me permitiu ter uma ideia geral de todo o processo envolvido neste tipo de ensaios.

Internamente a Tecnimede desenvolveu um conjunto de ferramentas que lhe permite otimizar o desenvolvimento dos planos de desenvolvimento clínicos dos diversos projetos que executa. Numa fase inicial, quando se inicia a etapa de desenvolvimento farmacêutico, a área dos EC realiza uma avaliação preliminar das características da formulação da(s) substância(s) ativas que vão ser alvo de desenvolvimento farmacêutico, esta avaliação inicial consiste na recolha e registo da informação essencial sobre as características farmacocinéticas, químicas e analíticas dos fármacos em desenvolvimento, bem como das características da formulação a ser desenvolvida (libertação imediata vs libertação

modificada), a recolha de toda esta informação numa fase precoce do desenvolvimento farmacêutico do projeto permite aferir o melhor plano de desenvolvimento clínico a ser conduzido no futuro (ie.: permite identificar a biodosagem, o desenho de estudo mais adequado (cruzado vs paralelo, jejum vs alimentos, população de estudo (apenas homens, ou inclusão de homens e mulheres, mas apenas pós-menopáusicas, o tipo de método analítico a ser usado: quiral vs aquiral, entre outros aspetos). Este documento é elaborado com base no Summary of Product Characteristics (SPC) e em guidelines de bioequivalência da European Medicines Agency (EMA) e da U.S. Food and Drug Administration (FDA), bem como em artigos científicos de estudos de bioequivalência já conduzidos com as mesmas substâncias ativas, sempre que necessário.

Após a conclusão do desenvolvimento farmacêutico e a transposição para escala industrial (ie.: o fabrico industrial de lotes da formulação de teste), avança-se com a condução dos ensaios clínicos que constam do plano de desenvolvimento clínico.

Um documento chave para a condução de qualquer ensaio clínico é o protocolo de ensaio, bem como o formulário de consentimento informado (ICF). O Protocolo de ensaio irá funcionar como um guia do ensaio e deve garantir a conformidade com as Good Clinical Practice (GCP) [7]. Deste modo, um protocolo deve detalhar todos os objetivos do estudo, definir o racional e a população em estudo, o desenho do estudo, a medicação em estudo, o tipo de aleatorização usado, os *endpoints* farmacocinéticos que serão determinados, definir todos os procedimentos que serão efetuados no decurso do estudo, os critérios de inclusão e exclusão, bem como as estratégias para avaliar a segurança dos participantes e ainda a análise estatística a adotar [7]. Este documento juntamente com o ICF e todos os documentos dados aos participantes de ensaio clínico são então submetidos à Comissão de Ética, que pode dar um parecer favorável, efetuando ou não questões previamente, ou rejeitar o protocolo de ensaio clínico.

Em paralelo, é também requerida, para a realização do ensaio, a submissão dos documentos do estudo bem como toda a documentação relacionada com os medicamentos experimentais (ME) (ex.: os lotes dos ME, os fabricantes dos ME, os certificados de análise para as substâncias ativas e para o produto final do medicamento de referência e do medicamento teste, os certificado que comprovem a ausência de Transmissible Spongiform Encephalopathies/Bovine Spongiform Encephalopathies (TSE/BSE) dos excipientes e do Active Pharmaceutical Ingredient (API) caso estes tenham origem animal, um comprovativo/declaração indicando que o API cumpre com as Good Manufacturing Practices

(GMP) bem como os seus dados de estabilidade e ainda a composição quantitativa/qualitativa (CQQ) do medicamento de teste) às autoridades competentes dos países onde o ensaio clínico vai decorrer. A apresentação destes documentos à(s) autoridade(s) competente(s) consiste na Clinical Trial Application (CTA). Mediante apresentação destes documentos as autoridades competentes analisam a viabilidade do estudo e emitem um parecer com a sua decisão. Após parecer favorável tanto das autoridades competentes como da comissão de ética é então iniciado o EC.

Para além da monitorização das várias etapas de um ensaio, cabe também a um CRA gerir/coordenar os envios da medicação experimental para o centro onde irá decorrer o ensaio.

Uma vez concluída a fase clínica do ensaio de biodisponibilidade/bioequivalência, é iniciada a etapa analítica, que consiste na determinação das concentrações plasmáticas das amostras sanguíneas recolhidas ao longo do tempo dos participantes do EC. Após a etapa analítica é realizada a análise estatística dos resultados das concentrações plasmáticas, na qual são determinados os parâmetros farmacocinéticos definidos no protocolo bem como os intervalos de confiança (IC) a 90% para os parâmetros que são usados para inferir a bioequivalência:  $C_{m\acute{a}x}$  e  $AUC_{0-t}$ . A última etapa de um ensaio clínico é a elaboração de um relatório final onde são reportados os resultados obtidos, é descrita uma análise estatística e ainda é feita uma discussão e conclusão dos resultados obtidos onde se infere e conclui sobre a bioequivalência do medicamento teste vs o medicamento de referência.

Enquanto departamento técnico-científico do Grupo Tecnimede o DMED, tem a seu cargo a elaboração de alguns módulos do Common Technical Document (CTD) (módulos clínicos, não-clínicos, bem como toda a documentação de segurança), que suportam a submissão do pedido de Autorização de Introdução no Mercado (AIM) de um medicamento às agências. Todas as áreas do DMED participam na elaboração destes módulos (Projetos de desenvolvimento, Compliance/Scientific Affairs, Farmacovigilância e Garantia da Qualidade). A inclusão dos EC conduzidos é englobada especificamente nos módulos 2.5 e 2.7, onde estão descritos os detalhes dos ensaios de bioequivalência realizados [10].

Após o término do EC e de acordo com os SOPs da área dos projetos de desenvolvimento, é realizado o *close-out* do estudo. Esta etapa corresponde ao encerramento do arquivo do estudo (arquivo do Promotor – Trial Master File). Nesta etapa é feita uma verificação do arquivo do estudo, por forma a confirmar se toda a documentação

referente ao estudo se encontra devidamente arquivada, e se fecham todos os assuntos pendentes.

Durante o meu estágio tive a oportunidade de realizar algumas tarefas inerentes a todas as etapas enumeradas anteriormente. Inicialmente, realizei alguns relatórios de informação preliminar dos projetos de desenvolvimento que iriam ser iniciados, de modo a conhecer melhor os medicamentos em estudo. Li vários protocolos e inclusivamente tive oportunidade de fazer revisão do protocolo de um EC. Posteriormente, fiquei responsável pela elaboração de um CTA para submissão de um novo ensaio às autoridades regulamentares. No que diz respeito à monitorização, não tive oportunidade de participar nesta etapa on-site, no entanto revi relatórios das várias visitas de monitorização realizadas aos centros clínicos e analíticos dos ensaios de bioequivalência conduzidos pelo Grupo Tecnimed, o que me permitiu ter uma ideia dos aspetos gerais de uma monitorização. Tive também oportunidade de colaborar na aquisição da medicação experimental, nomeadamente a inclusão dos dados da medicação na base de dados, o envio de medicação para os centros de ensaio e ainda a sua verificação e controlo de temperatura de transporte. Por último, tive também oportunidade de ler e rever relatórios finais de alguns ensaios bem como os respetivos CTDs e de preencher os documentos de *close-out* dos ensaios que tinham sido concluídos.

#### **v. Apoio prestado pela equipa**

Como referido anteriormente, o DMED é constituído pelas seguintes áreas: Projetos de Desenvolvimento, Farmacovigilância, Compliance/Scientific Affairs e Garantia de Qualidade. Todas estas equipas se interligam de certa forma e trabalham diariamente em conjunto nos vários objetivos comuns. Como tal, durante o estágio tive a oportunidade de trabalhar com elementos das diferentes áreas do departamento, o que contribuiu para que ganhasse alguns conhecimentos nessas áreas.

O DMED é constituído por uma equipa jovem, o que facilitou a minha integração, uma vez que sempre houve um esforço para me envolver em todas as tarefas desenvolvidas. Qualquer dificuldade que tenha sentido inicialmente foi facilmente ultrapassada com o auxílio dos meus colegas que sempre se mostraram disponíveis para me ajudar em tudo o que fosse necessário. Para além disso, o facto de ter trabalhado em conjunto com as várias equipas que têm já alguma experiência na área, contribuiu para que

adquirisse conhecimentos e que recebesse conselhos que se tornaram muito úteis para as tarefas que desempenhei ao longo do estágio.

## **b. Pontos Fracos**

### **i. Duração do estágio**

Considero que a duração do estágio é curta e não nos permite tirar o máximo proveito do estágio. Na verdade, no primeiro mês tive uma fase mais teórica de aprendizagem em que li vários documentos referentes aos EC, que considero que foi imprescindível para o resto do estágio. Os restantes dois meses serviram para por em prática os conhecimentos adquiridos. No entanto, estes dois meses não foram suficientes para me tornar autónoma nas minhas tarefas, tendo sentido muitas vezes a necessidade de recorrer aos meus colegas para esclarecimento de dúvidas. Para além disso, uma vez que um EC habitualmente demora vários meses até que seja concluído, não tive a oportunidade de acompanhar um EC desde o seu início até ao seu final. Como tal, considero que para que seja possível tirar vantagem destes estágios, deve haver um aumento da duração do estágio para cerca de 6 meses. Este prolongamento do estágio irá permitir uma formação adequada e uma progressiva introdução do estagiário nas tarefas diárias com consequente aumento das responsabilidades e da autonomia.

### **ii. Lacunas no programa curricular do MICF**

No início do estágio rapidamente me deparei com alguma falta de conhecimentos na área dos EC, o que foi em parte colmatado pela formação inicial que tive na Tecnimede. Na verdade, ao longo do curso, abordamos a temática dos EC em cadeiras como Farmacoepidemiologia e Farmacovigilância e Gestão e Garantia de Qualidade. No entanto, este não é o principal foco das cadeiras acima mencionadas, sendo apenas abordados tópicos específicos, nomeadamente as GCP e os tipos de estudo. Como tal, penso que seria interessante existir uma cadeira opcional de EC de modo a que quem tenha interesse na área, a possa explorar.



## **c. Oportunidades**

### **i. Apresentação oral para o DMED**

Durante o meu estágio foi-me proposta a preparação de uma apresentação para todo o DMED subordinada ao tema “Guidelines for Good Pharmacoepidemiology Practice (GPP)”. Estas guidelines aplicam-se, sobretudo, a estudos farmacoepidemiológicos, fugindo um pouco ao âmbito dos ensaios vulgarmente realizados na Tecnimede. No entanto, no sentido de explorar a aplicabilidade destas GPP em futuros estudos, surgiu a oportunidade de preparar uma apresentação para os meus colegas. Nesta apresentação fiz um enquadramento das GPP num contexto geral e expliquei os seus aspetos principais.

Considero que esta apresentação oral foi muito desafiante quer a nível pessoal quer a nível profissional. De facto, tive oportunidade de desenvolver as minhas competências a nível da comunicação oral e de debater ideias e conhecimentos com os restantes membros da equipa. Para além disso, permitiu ainda contactar com um tipo de estudo diferente dos que estava habituada.

Para além da minha apresentação oral, ocorreu no DMED durante o período do meu estágio um programa de apresentações orais intitulado “Jornal club” onde os restantes colegas tiveram também oportunidade de efetuar apresentações orais de artigos científicos inerentes às suas áreas de trabalho. Penso que estas palestras promovidas pelo DMED são extremamente importantes para uma aprendizagem contínua do departamento, permitindo que este esteja sempre atualizado.

### **ii. Formação com várias áreas do DMED**

Uma parte muito importante do meu estágio foi as formações que tive oportunidade de assistir. Na verdade, o facto de o DMED ser constituído por várias equipas contribuiu para que aprendesse um pouco mais sobre todas as áreas envolvidas.

A farmacovigilância é uma área muito importante dentro da empresa uma vez que trata de todas as reações adversas aos medicamentos comercializados pela Tecnimede, como tal, é do interesse geral que seja supervisionada e assegurada a segurança dos medicamentos comercializados. Uma vez que qualquer pessoa dentro da empresa pode tomar conhecimento de uma reação adversa, é importante que todos os seus membros tenham conhecimento dos procedimentos a adotar para notificar uma reação adversa. Deste

modo, toda a empresa é obrigada a ter uma formação neste âmbito. Como a farmacovigilância está integrada no mesmo departamento dos EC tive oportunidade de ter uma formação mais específica com um dos seus elementos. Com esta formação fiquei a compreender melhor o que é a farmacovigilância e qual o trabalho desenvolvido nesta área.

Na área de Garantia de Qualidade tive também oportunidade de receber uma formação promovida pela Dra. Ana Real, responsável por esta área no DMED. Na verdade, a garantia de qualidade é uma parte importante do DMED uma vez que este é certificado de acordo com a norma ISO 9001. Para este fim, foi necessário criar um Sistema de Gestão de Qualidade que se baseia na metodologia PDCA (Plan-Do-Check-Act) e que tem como objetivo uma melhoria contínua do departamento de modo a melhorar a satisfação do cliente.

Por último, tive várias formações no âmbito dos EC. Primeiro apresentaram-me os EC de bioequivalência e explicaram-me algumas das tarefas que poderia vir a desenvolver, nomeadamente, o envio e aquisição de medicação e o contato com as etapas de monitorização clínica e analítica. Estas formações foram extremamente importantes uma vez que eram dirigidas especificamente para um CRA.

Para além disso, tive também uma breve introdução e contextualização dos estudos de Fase II/III a decorrer no DMED, o que me permitiu ter uma ideia de outro tipo de ensaios desenvolvidos no departamento.

#### **d. Ameaças**

##### **i. Produtos de referência com formulações mais complexas e novos enquadramentos regulamentares**

Atualmente os medicamentos inovadores desenvolvem formulações mais complexas, cada vez mais a indústria de medicamentos genéricos se depara com patentes de composição e formulação que tornam mais desafiante e complexo o desenvolvimento farmacêutico dos medicamentos genéricos, o que faz com que todo o processo de desenvolvimento farmacêutico, transposição para escala industrial e condução de ensaios clínicos se torne mais longo.

Um dos objetivos do Grupo Tecnimede é a internacionalização e atualmente existe um vasto interesse em desenvolver medicamentos genéricos para o mercado Brasileiro. Esta opção estratégica do Grupo Tecnimede constitui um enorme desafio interno para todas as

áreas incluindo a dos EC uma vez que os requisitos regulamentares e mesmo as questões técnico-científicas de condução de ensaios clínicos de biodisponibilidade/bioequivalência são diferentes entre a Europa e o Brasil. Existe portanto, a necessidade de adaptação e otimização dos procedimentos internos aos novos enquadramentos regulamentares para os quais são submetidos os *dossiers* de AIM. Como tal, de maio a julho o número de ensaios clínicos ativos não foi suficiente para que pudesse contactar com todas as etapas dos ensaios. Para além disso, como referi anteriormente o tempo de estágio é curto o que também não proporcionou o meu maior envolvimento nos estudos.

Assim sendo, penso que, de forma a complementar o trabalho que é desenvolvido durante o estágio e de forma a aproveitar melhor o tempo disponível, o estagiário deve ter a possibilidade de participar em mais formações, inclusivamente formações com outros departamentos de modo a ter uma ideia geral do trabalho desenvolvido na Indústria.

#### **4. Considerações Finais**

Em suma, considero que o estágio no Grupo Tecnimede foi uma ótima experiência profissional uma vez que me permitiu adquirir conhecimentos base na área dos EC, que de outra forma não teria sido possível, visto que são poucas as empresas farmacêuticas dedicadas ao planeamento, gestão, monitorização e condução de EC em Portugal, isto é, que possuam departamentos de ensaios clínicos com CRAs e CTPMs internos. Apesar de considerar que poderia ter desempenhado mais tarefas e que o estágio poderia ter tido uma duração maior, sinto que contribuiu para aplicar conhecimentos adquiridos ao longo do percurso académico e também para introduzir novos conceitos até então desconhecidos. Tenho a certeza, que tudo o que aprendi neste estágio será muito importante para qualquer uma das áreas onde irei exercer a minha atividade profissional, uma vez que esta é uma área base do sector farmacêutico.

Por último, gostaria de agradecer a todo o DMED pela oportunidade de realizar este estágio e por terem contribuído para que esta experiência fosse tão enriquecedora.

## 5. Referências

- [1]. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Indústria Farmacêutica**. [Consultado a 22 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/industria-farmaceutica/>
- [2]. GRUPO TECNIMEDE – **Sobre**. [Consultado a 22 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.tecnimede.com/pt/grupo-tecnimede/sobre>
- [3]. GRUPO TECNIMEDE – **História**. [Consultado a 22 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.tecnimede.com/pt/grupo-tecnimede/historia>
- [4]. GRUPO TECNIMEDE – **Tecnimede no Mundo**. [Consultado a 22 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.tecnimede.com/pt/tecnimede-no-mundo/sobre>
- [5]. Decreto-Lei n.º 176/2006 - Diário da República n.º 167/2006, Série I de 2006-08-30. **Regime jurídico dos medicamentos de uso humano**. Lisboa, Abril 2017
- [6]. EUROPEAN MEDICINES AGENCY – **Guideline on the investigation of bioequivalence**. Doc. Ref.: CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr \*\* London, United Kingdom: Committe for Medicinal Products for Human Use (CHMP); January 2010
- [7]. EUROPEAN MEDICINES AGENCY – **Guideline for good clinical practice E6(R2), Step 5 version**. Doc. Ref.: EMA/CHMP/ICH/135/1995. London, United Kingdom: Committe for Medicinal Products for Human Use (CHMP); December 2016
- [8]. EUROPEAN COMISSION – **Guideline on Good Distribution Practice of medicinal products for human use**. OJ C 343, November 2013
- [9]. EUROPEAN COMISSION – **EU Guidelines to Good Manufacturing Practice**. Doc. Ref.: ENTR/F/2/AM/an D(2010) 3374; Brussels, February 2010
- [10]. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) - **Organization of the Common technical document for the registration of Pharmaceuticals for human use, Step 4 version**. January 2004

## Parte III.

“Liquid chromatographic methods for the determination of direct oral anticoagulant drugs in biological samples: A critical review”

**ADAPTED FROM:** GOUVEIA, F., BICKER, J., GONÇALVES, J., ALVES, G., FALCÃO, A., FORTUNA, A. Liquid chromatographic methods for the determination of direct oral anticoagulant drugs in biological samples: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 1076 (2019) 18-31.

## Abstract

Direct oral anticoagulant drugs (DOACs) are the first-line drugs used on the treatment of venous thromboembolism and prevention of stroke in patients with atrial fibrillation particularly because DOACs do not require the regular biochemical monitoring that is mandatory for warfarin, and they exhibit shorter half-lives and a faster onset of action. Since recent real-world studies evidence higher prevalence of adverse side effects than it was anticipated in clinical trials, monitoring plasma concentrations of DOACs is starting to be used for personalizing their pharmacotherapy in accordance to individual characteristics and to assess therapy adherence.

To attain the aforementioned clinical unmet need, there are specific coagulation assays available that indirectly assess the plasma concentrations of DOACs, however they are not sufficiently accurate or sensitive. Indeed, liquid chromatography techniques, mainly coupled with mass spectrometry detection, are considered the gold standard methods to accurately assess DOACs plasma concentrations.

Therefore, the present paper aims at providing, for the first time, a comprehensive review of the current analytical methods that were developed and validated for the quantitative determination of apixaban, dabigatran, rivaroxaban and/or edoxaban and their main metabolites in biological samples. The chromatographic methods will be particularly highlighted and an emphasis will be placed on the major difficulties faced during optimization and development steps. In addition, physicochemical characteristics, pharmacokinetics and pharmacodynamics of each drug will be herein critically related with the employed chromatographic conditions as well as their influence on pre-treatment procedures and storage conditions of DOACs, suggesting strategies that should be employed to accurately quantify DOACs in biological samples.

**Keywords:** Liquid chromatography; Direct oral anticoagulant drugs; Rivaroxaban; Edoxaban; Apixaban; Dabigatran.

## Resumo

Os Anticoagulantes orais diretos (DOACs) são os medicamentos de primeira linha usados no tratamento do tromboembolismo venoso e na prevenção de acidentes vasculares cerebrais em doentes com fibrilação auricular, sobretudo porque os DOACs não requerem a monitorização bioquímica tipicamente obrigatória para a varfarina e porque apresentam tempos de meia-vida mais curtos e início de ação mais rápido. Uma vez que estudos recentes na população real evidenciaram uma maior prevalência de efeitos secundários comparativamente aos que estavam previstos nos Ensaios clínicos iniciais, a monitorização plasmática dos DOACs está a começar a ser cada vez mais utilizada de modo a permitir uma personalização da farmacoterapia de acordo com as características individuais do doente e de modo a avaliar a adesão à terapêutica.

Para satisfazer as necessidades clínicas mencionadas previamente, estão disponíveis ensaios de coagulação específicos que determinam indiretamente a concentração de DOACs, no entanto estes não são suficientemente precisos e sensíveis. Na verdade, as técnicas de cromatografia líquida, sobretudo associadas à deteção de espectrometria massa, são atualmente consideradas os métodos mais adequados para determinar as concentrações plasmáticas dos DOACs com precisão adequada.

Deste modo, esta monografia tem como objetivo fornecer pela primeira vez uma revisão dos métodos analíticos desenvolvidos e validados até à presente data, para a determinação quantitativa do apixabano, dabigatrano, edoxabano, rivaroxabano bem como os seus metabolitos principais em amostras biológicas. Será dado um maior ênfase aos métodos cromatográficos e às principais dificuldades sentidas durante a otimização e validação das várias etapas. Para além disso, as características físico-químicas, a farmacocinética e a farmacodinâmica dos vários fármacos serão relacionadas com as condições cromatográficas aplicadas, assim como a sua influência nos procedimentos de pré-tratamento da amostra e nas condições de armazenamento dos DOACs, sugerindo estratégias de otimização dos métodos de quantificação dos DOACs.

**Palavras-Chave:** Cromatografia líquida; anticoagulantes orais diretos; Rivaroxabano; Edoxabano; Apixabano; Dabigatrano.

## Abbreviations

**ABC:** ATP-binding cassette

**AUC:** Area under the plasma concentration versus time curve

**BCRP:** Breast Cancer Resistance Protein

**BEH:** Bridged ethyl hybrid

**C<sub>max</sub>:** Maximum plasma concentration

**CrCl:** Creatinine clearance

**CYP:** Cytochrome-P450

**DAD:** Diode-array detection

**DMSO:** Dimethyl sulfoxide

**DOAC:** Direct oral anticoagulant

**EMA:** European Medicines Agency

**ESI:** Electrospray ionization

**FDA:** Food and Drug Administration

**FXa:** Factor Xa

**HPLC:** High performance liquid chromatography

**ICH:** Intracranial hemorrhage

**IS:** Internal standard

**K<sub>i</sub>:** Inhibition constant

**LLE:** Liquid-liquid extraction

**LLME:** Liquid-liquid microextraction

**LLOQ:** Lower limit of quantification

**MEPS:** Microextraction by packed sorbent

**MIP:** Molecularly imprinted polymers

**MRM:** Multiple reaction monitoring

**MS:** Mass spectrometry



**MS/MS:** Tandem mass spectrometry

**o.d:** Once daily

**P-gp:** P-glycoprotein

**PDE5i:** Type 5-phosphodiesterase inhibitor

**PP:** Protein precipitation

**PSA:** Polar surface area

**SPAF:** Stroke prevention in atrial fibrillation

**SPE:** Solid-phase extraction

**SPME:** Solid-phase microextraction

**t.d:** Twice-daily

**$t_{1/2}$ :** Elimination half-life

**$T_{max}$ :** Time to reach  $C_{max}$  in plasma

**UHPLC:** Ultra-high performance liquid chromatography

**UV:** Ultravioleta

**VTE:** Venous thromboembolism

## I. Introduction

During the last decade, direct oral anticoagulants (DOACs) have emerged as alternative drugs to warfarin for the prevention of stroke in patients with atrial fibrillation and venous thromboembolism (VTE). In Europe, four DOACs are currently available in clinical practice (**Figure 1**), although the US Food and Drug Administration (FDA) very recently approved a fifth DOAC, betrixaban (**Figure 1**), for extended prophylaxis of VTE in acute medically ill patients. While dabigatran, the active moiety of the prodrug dabigatran etexilate, specifically inhibits thrombin, the other four, rivaroxaban, apixaban, edoxaban and betrixaban, directly inhibit factor Xa (FXa) (**Figure 2**) [1,2].

Several studies showed that the aforementioned non-vitamin K oral anticoagulant drugs are advantageous compared to warfarin as they have a wider therapeutic window, more predictable pharmacological effects and minor potential to interact with other drugs or food [3,4]. Indeed, it is stated that DOACs do not require the regular biochemical monitoring or dose adjustment, which is mandatory for warfarin. Furthermore, DOACs have shorter half-life times and faster onset of action, which are strong advantages as they promote a faster recovery of hemostatic ability than warfarin, reducing the bleeding risk [1]. Nonetheless, the fact that plasma monitoring is not required seems to increase the likelihood of lowering drug adherence [5]. This is particularly alarming for once-daily drugs, such as rivaroxaban and edoxaban, since a missing dose leads to a lower trough in drug concentrations, which strongly compromises the therapeutic effect [1].

Dabigatran etexilate, rivaroxaban, apixaban, betrixaban and edoxaban share similar pharmacological properties. They are all metabolized by cytochrome-P450 (CYP) enzymes, namely CYP3A4, and they all interact with efflux ATP-binding cassette (ABC) transporters, namely P-glycoprotein (P-gp) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). Therefore, their co-administration with drugs that are substrates, inducers, activators or inhibitors of CYP3A4, P-gp or BCRP affect DOACs plasma concentrations and, consequently, their efficacy and safety. Indeed, clinical studies demonstrated that drugs that inhibit P-gp, BCRP or CYP3A4 increase the intestinal absorption and decrease the metabolism of DOACs, enhancing their plasma concentrations and their bleeding risk. On the other hand, drugs that induce CYP3A4, P-gp or BCRP decrease the plasma concentrations of DOACs and compromise their effectiveness [6]. For instance, the interaction between rivaroxaban and apixaban with three type 5-phosphodiesterase inhibitor (PDE5i), sildenafil, tadalafil and vardenafil, that are well-known P-gp inhibitors, was assessed applying *in vitro* methodologies,

which demonstrated that all three PDE5i strongly inhibited the P-gp-mediated efflux of both DOACs [7]. Although some research on this area has been recently conducted, further investigation is still required to discover potential interactions not only with other drugs, but also with food and herbal supplements [6]. Moreover, it is well known that BCRP and P-gp have genetic polymorphisms and, hence, genetic variations of these efflux transporters may cause a loss of function and alter the target plasma concentrations of DOACs, modifying drug responses [8]. Recent clinical studies reported that *ABCB1* genetic polymorphism did not clinically change the pharmacokinetics of rivaroxaban or dabigatran, highlighting, however, that coadministration of a P-gp/CYP3A4 inhibitors may warrant caution in patients at risk of overexposure [9]. No less important is the fact that dose adjustments of DOACs are recommended in special clinical conditions, including renal impairment, patients with extremes of weight and elderly [10]. Indeed, plasma concentrations of DOACs are highly correlated with kidney function and, hence, failures on dose reduction of DOACs are associated to a higher bleeding rate than those reported in clinical trials [11]. Moreover, a higher bleeding risk has also been demonstrated for DOACs when an excessive dose was given and consequently higher plasma concentrations were observed [12]. According to Pernod *et al.*, during invasive procedures such as neurosurgery, the plasma concentrations of DOACs must be known in order to assess the risk of bleeding and the need for a reversal treatment [13]. Furthermore, it has been suggested that DOACs antidotes are dose-dependent, requiring, hence, monitoring [14].

Thus, although therapeutic drug monitoring was not originally required for DOACs, with the increasing number of patients taking DOACs, clinical experts are realizing that monitoring may be mandatory in some situations. The need of quickly assessing the anticoagulation levels of patients as well as the lack of tests to accurately quantify plasma concentrations of DOACs have drawn the attention of the clinical experts, who currently acknowledge that accurate and precise methods are required for the quantification of DOACs concentrations in plasma samples. Such methods must be selective and accurate to quantify DOACs in plasma within a short period of time. In order to achieve this goal, high resolution analytical techniques are required namely high performance liquid chromatography (HPLC) and ultra-HPLC (UHPLC). Therefore, this paper aims at providing, for the first time, a comprehensive review of the current analytical methods available for the quantitative determination of DOACs in several biological matrices, highlighting the particular role of HPLC and UHPLC. The several sample pre-treatment procedures, storage

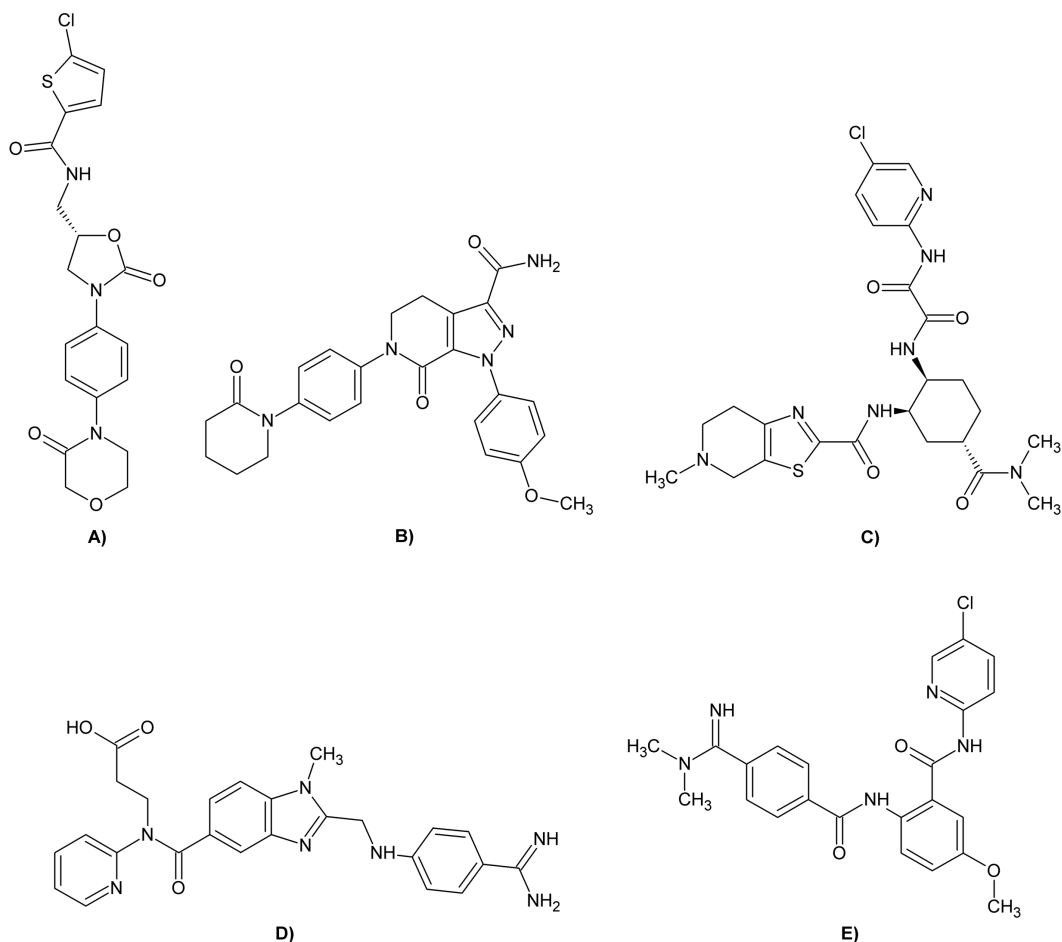
conditions and chromatographic parameters reported for each DOAC will also be compared. Additionally, the physicochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of each DOAC will be reviewed, along with their safety and toxicity profiles, updating the specificities that these drugs require to be successfully extracted, stored, separated and accurately measured.

## 2. Physicochemical properties and stock solutions of DOACs

With the exception of apixaban, all DOACs share an amide functionality, which renders them a more flexible structure than apixaban [18]. Due to their different substituent groups, it is expected that they exhibit distinct physicochemical characteristics (**Figure 1**). Thus, as summarized in **Annex 1**, DOACs have a molecular weight that ranges between 435.88 and 627.73 g.mol<sup>-1</sup> [18-20]. As expected, because it is a prodrug, dabigatran etexilate shows the highest molecular weight due to its ethyl group in the carboxylic acid and the hexyloxycarbonyl side chain in the amidine [20]. Both groups increase the solubility and incorporation into an oral drug formulation, allowing oral administration of dabigatran. Identically, edoxaban follows dabigatran etexilate, presenting a molecular weight considerably higher than rivaroxaban, apixaban and betrixaban, justifying, probably, why edoxaban displays a lower bioavailability compared to rivaroxaban and apixaban (**Annex 2**). Regarding polar surface area (PSA), dabigatran and dabigatran etexilate showed the highest values (150.22 and 154.05 Å, respectively **Annex 1**), while rivaroxaban exhibited the lowest value (88.18 Å) which may, together with the lower molecular weight, justify its higher bioavailability (around 80%, **Annex 2**) [18-20]. Indeed, drug permeability through biological membranes, such as small intestine and blood-brain-barrier, decreases as PSA increases [22,23].

Water solubility and lipophilicity were predicted by means of the ALOGPs method [18,24]. Lipophilicity is expressed quantitatively as LogP where P is the partition coefficient of the molecule in a water–octanol system. Although this is a parameter commonly used for assessing the permeability of compounds, it is not applicable for compounds with ionizable groups. In these cases, the coefficient of distribution is a better descriptor, since it takes into account not only the intrinsic lipophilicity but also the extent of ionization [10]. Dabigatran presents a moderate lipophilicity when compared with its prodrug (Log P values of 2.17 and 5.17, respectively, **Annex 1**) [19]. The water solubility of DOACs ranges between 4.66 (dabigatran etexilate) and 97.47 mg L<sup>-1</sup> (dabigatran), suggesting that, with the exception of

dabigatran, all DOACs are slightly soluble in water but sufficiently lipophilic to be quickly absorbed [18-20]. Indeed, accordingly, in **Annex 2** it is revealed that all DOACs attain their maximum plasma concentration (C<sub>max</sub>) up to 4 h after administration [25].



**Figure 1.** Chemical structures of A) rivaroxaban, B) apixaban, C) edoxaban, D) dabigatran and E) betrixaban.

Complementary, DOACs have different acid-basic behaviors that may influence their absorption and biodisposition, since only the non-ionized forms are able to cross biological membranes. As dabigatran is an amphoteric compound in water due to its acid (carboxylic acid) and basic (benzamidine) groups [19], it can exist in solution as four different chemical species (positive, zwitterionic, neutral and negative forms) in different proportions, which are determined by its dissociation constant and by the pH of the medium. These different species have distinct physicochemical properties and consequently different behaviors: neutral species tend to be more lipophilic and therefore have greater permeability than charged species (zwitterionic, positive and negative forms), which tend to be more water-soluble. Specifically, at the intestinal pH, zwitterionic species of dabigatran prevail, increasing

its polarity in such a way that limits its bioavailability [25]. These characteristics justify why dabigatran is marketed as the prodrug dabigatran etexilate, which is less basic and hydrophilic and, consequently, more quickly and extensively absorbed. Once absorbed, dabigatran etexilate is rapidly metabolized to the active main metabolite, dabigatran [19]. In turn, rivaroxaban exhibits a chiral carbon atom in position 5 and has two enantiomers *R* and *S* with a remarkable preference for the *S* conformation [18]. Like apixaban, rivaroxaban has no ionizable groups and therefore its aqueous solubility is not dependent of pH conditions. This can be an advantage compared to other DOACs, since they can be concomitantly administered with food and/or drugs that can influence gastrointestinal pH [26]. This will be a relevant keynote to take into account when developing the chromatographic methodologies to identify apixaban and rivaroxaban since pH mobile phase adjustment will not be required. Edoxaban exists as a diastereomer with an *S*-configuration at the chiral C-1 and C-4 atoms and *R*-configuration in the chiral C-2 atom, exhibiting a basic nitrogen atom on the 5-methylthiazolopyridine moiety [20]. At physiological pH, edoxaban appears to be slightly protonated, promoting a moderate bioavailability *in vivo* (62%) [20]. Similarly, betrixaban exhibits two amide groups that are almost planar and water solvents seem to not affect the overall shape of betrixaban. Nevertheless, it has ionizable groups and, therefore, its administration can be influenced when taken with food and its identification by HPLC will demand pH mobile phase adjustment [2,18]. The ionized degree of DOACs also determines the interaction of the analytes with mobile and stationary phases during liquid chromatographic analysis since each chemical species has distinct lipophilicity and water solubility which determine the interactions with the both chromatographic phases and, consequently, the retention times of the compound. Indeed, the retention time depends not only on the pKa of the compound, but also on the pH of the mobile phase. Therefore, choosing the more adequate mobile phase with the appropriate pH according to the acid-basic behavior of the compound will improve the performance of the liquid chromatography. This reasoning will be in deeply discussed in **Section 4.3.3**.

Considering the previously mentioned physicochemical properties of DOACs, it is not surprising that the published studies have commonly used solvents such as methanol and acetonitrile for the preparation of stock solutions [27-43]. Some authors also used dimethyl sulfoxide (DMSO) and hydrochloric acid (HCl) 0.1 N [27,35-37,43,44]. Particularly considering dabigatran, HCl 0.1 N is included in most stock solutions presented in literature, probably to increase its solubility in organic solvents [27,36,43].

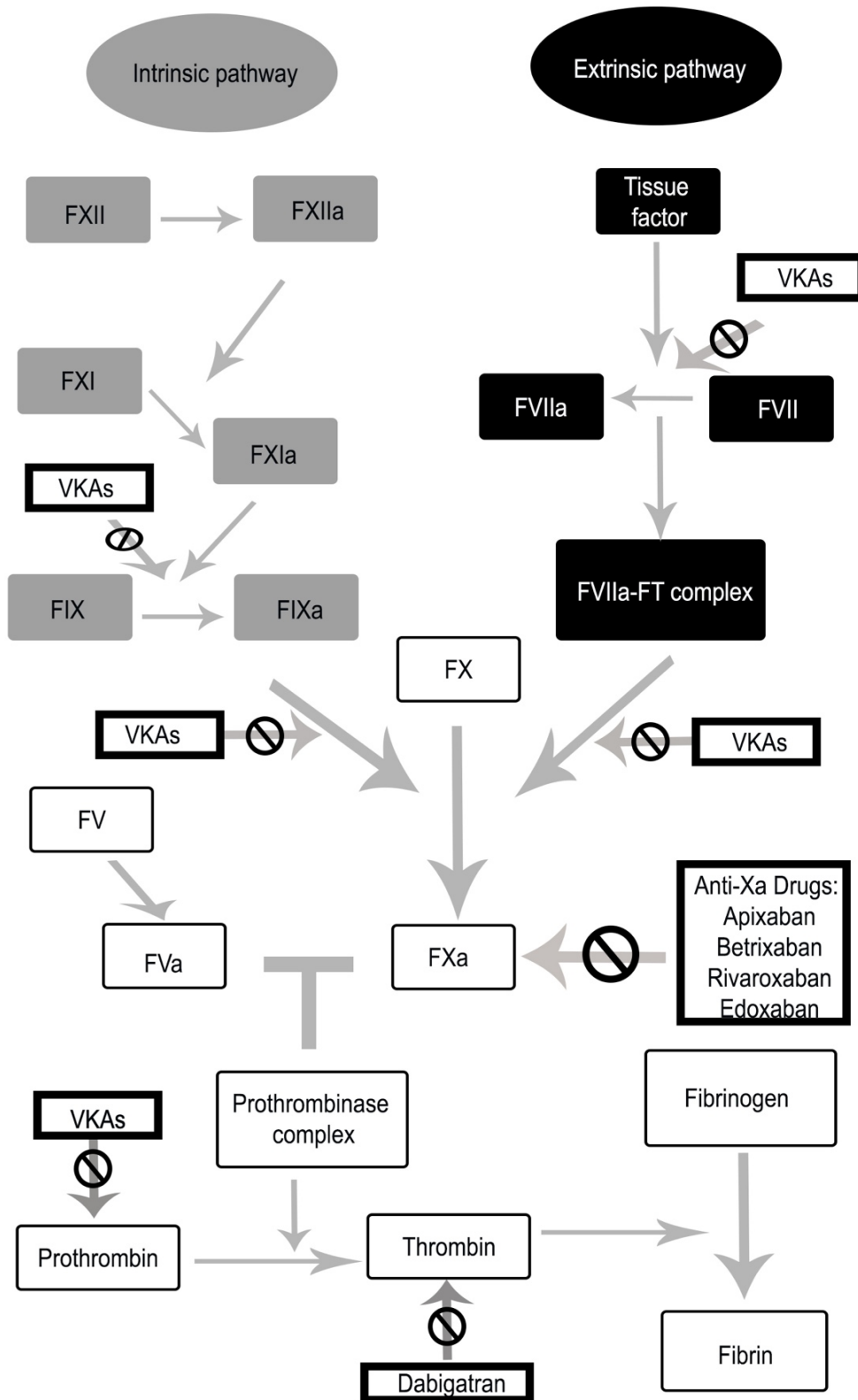
### 3. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties

Among the available DOACs, dabigatran is the only oral anticoagulant that operates exclusively by reversibly binding to the active site of thrombin, avoiding the cross-linking of fibrin monomers. The remaining ones (rivaroxaban, edoxaban, apixaban and betrixaban) are highly selective, reversible inhibitors of FXa, blocking the interaction with prothrombin (**Figure 2**). Distinctively from warfarin, which acts as a vitamin K antagonist, a key cofactor in the synthesis of the coagulation factors II, VII, IX and X and the anticoagulant proteins C and S, DOACs are small non-peptidic molecules that target systems involved in the amplification of the coagulation cascade. Furthermore, their pharmacokinetic and pharmacodynamics profiles seem to be more predictable than those of warfarin, which is one of the main reasons for not being mandatory the routine therapeutic drug monitoring. Also, four Phase III randomized clinical trials (ARISTOTLE, RE-LY, ROCKET-AF, and ENGAGE AF-TIMI 48) demonstrated that the efficacy of DOACs was comparable, or even better, than that of warfarin [4,45-47]. Nevertheless, all of them interfere in the coagulation cascade and consequently hemorrhage is expected to occur as side effects. In fact, hemorrhage is the most common side effect of DOACs therapy, limiting their use in people with active bleeding [48]. According to Phase III clinical trials, all DOACs demonstrated a lower risk of causing intracranial hemorrhage (ICH) than warfarin, suggesting that their use is preferable in patients with history of ICH or with high risk of developing ICH [48,49]. On the other hand, gastrointestinal hemorrhage is one of the most reported side effects among patients taking DOACs. In fact, when administered at a dose of 150 mg, dabigatran has a higher risk of developing hemorrhage compared to warfarin. Furthermore, rivaroxaban and edoxaban showed higher rates of gastrointestinal bleeding. Thus, patients with history of gastrointestinal bleeding or that are concomitantly taking drugs that affect the gastrointestinal tract, such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs, should be recommended for a risk assessment for gastrointestinal bleeding before beginning treatment with these DOACs in order to ensure safety [49,50].

Negative outcomes are not only harmful *per se*, but also correlated with a bad adherence to treatment. In general, non-adherence is higher for drugs administered twice a day, such as dabigatran and apixaban [51]. Nonetheless, when twice administered, drugs plasma concentrations exhibit lower fluctuations between peak and trough levels relatively to those observed for rivaroxaban and edoxaban, which are administered once daily [51]. In fact, pharmacokinetic studies of DOACs revealed that a missing dose on the last regimen

corresponds to two consecutive missing doses in the twice day regimen. On the other hand, an extra dose increases the plasma peak in the once day regimen more than in the twice day regimen. In practice, this information corroborates the importance of assessing plasma concentrations of DOACs [51].





**Figure 2.** Schematic representation of the coagulation cascade with the respective sites of action of the direct oral anticoagulant drugs and vitamin k antagonists. Factors involved in the intrinsic pathway, extrinsic pathway and common pathway are represented in grey, black and white respectively.

## a) Dabigatran

As described in **Section 2**, dabigatran is a very hydrophilic compound, a characteristic that compromises its gastrointestinal absorption [25]. To overcome this limitation, dabigatran is clinically available as the prodrug dabigatran etexilate, which has an ethyl group in the carboxylic acid and a hexyloxycarbonyl side chain in the amidine (**Figure 1**) [25]. It is commercialized in capsules containing pellets with 0.8 mm of diameter that consist of a tartaric acid core coated with dabigatran etexilate. Tartaric acid provides the acidic environment that will further promote dabigatran etexilate absorption in the intestinal tract, independently of the pH of the environment [25,52].

As the remaining DOACs, dabigatran etexilate is rapidly absorbed in the intestinal tract. However, it shows a bioavailability of only 6%, because after absorption, dabigatran etexilate is immediately hydrolyzed by esterases expressed in the enterocytes, portal vein and liver, originating the active metabolite, dabigatran [25,52,53]. Consequently, the prodrug is almost undetectable in patients' plasma. Moreover, although co-administration of dabigatran etexilate with food does not seem to affect  $C_{max}$  or the area under the plasma concentration versus time curve (AUC), it seems to enlarge the time to reach  $C_{max}$  in plasma ( $T_{max}$ ) from 2 to 4 h [25].

Dabigatran reaches peak concentrations 2-3 h after oral administration of the prodrug and attains plasma concentrations lower than 30% of the  $C_{max}$  within 4-6 h, reflecting its rapid distribution phase [25,53,54]. Additionally, dabigatran binds to plasma proteins in a percentage of only 35% and has an apparent volume of distribution of 60-70 L, which slightly exceeds the total body water volume, suggesting a moderate tissue distribution [25].

In contrast with its rapid distribution, elimination of dabigatran is lengthened, presenting a mean plasma terminal elimination half-life ( $T_{1/2}$ ) of around 12-14 h, in healthy young and elderly people. Approximately, 77% of dabigatran is eliminated by kidney in its original form and 4% as glucuronide conjugates, while the remaining 20% is conjugated in the liver, forming active metabolites that are eliminated via bile [25,52,55]. Importantly, only a small amount of dabigatran is subject to cytochrome-P450 (CYP)-mediated metabolism, thus, making it less susceptible to interact with other drugs than for example warfarin or other DOACs [25,52,53].

Nonetheless, dabigatran etexilate, but not dabigatran, is a P-gp substrate, and, hence, its coadministration with strong P-gp inhibitors (e.g. verapamil and clarithromycin) increases dabigatran etexilate absorption and plasma concentration with consequent dabigatran production; in opposition, coadministration with strong P-gp inducers (e.g. rifampicin or St John's wort) may decrease prodrug absorption and the plasma concentration of the active metabolite. These interactions are so significant that dose adjustments are required in patients treated with both compounds [52]. Indeed, the European Medicines Agency (EMA) currently recommends the reduction of the dose of dabigatran etexilate when given in conjunction with amiodarone, a P-gp substrate, after hip or knee arthroplasty. This results from the fact that after coadministration of dabigatran etexilate and amiodarone, the  $C_{max}$  and AUC of dabigatran have increased approximately 50% and 60%, respectively. Moreover, quinidine, a strong P-gp inhibitor, is currently contraindicated in patients under treatment with dabigatran etexilate [56].

On the other hand, as the kidneys contribute to 80% of the clearance of dabigatran, the renal function undoubtedly influences its elimination. The RE-LY clinical trial concluded that plasma concentrations of dabigatran strongly depend on demographic factors, with special focus on the elderly, probably due to the renal impairment usually observed in this group [4]. Since patients with impaired renal function have compromised elimination rates, the half-life of dabigatran is considerably prolonged and its systemic exposure is increased. Consequently, dose adjustments are required in patients with renal impairment and currently, a 50% dose reduction is suggested in patients with a creatinine clearance (CrCl) between 30-50 mL min<sup>-1</sup>; dabigatran is even contraindicated in patients with CrCl < 30 mL min<sup>-1</sup> although it can be dialyzable [4,25,52].

## **b) Rivaroxaban**

Rivaroxaban is rapidly absorbed in the intestinal tract but has a higher bioavailability (80%) than the other DOACs (**Annex 2**), hence not requiring doses as high as those of dabigatran [52,53]. In fact, rivaroxaban is marketed as tablets and it is indicated to be administered as a single daily dose of 10 mg for the prevention of VTE and 20 mg for stroke prevention in atrial fibrillation (SPAF) [57].

After oral administration,  $C_{max}$  of rivaroxaban is attained within 2-4 h [25]. In spite of exhibiting a high affinity for plasma proteins (92-95%), with albumin being the main binding

component, rivaroxaban presents a moderate volume of distribution (50 L), indicating some affinity for tissues and not only for plasma proteins [25,52,58]. Due to its high plasma protein binding, rivaroxaban was subjected to drug-drug interaction clinical studies in order to assess the influence of the co-administration of acetylsalicylic acid and non-steroidal anti-inflammatory drugs on its pharmacokinetics and clotting effects. The observed effects were small and were not considered to be clinically relevant [59-61].

Rivaroxaban has a dual model of elimination: one-third of the drug is eliminated in the unchanged form in urine, while the other two-thirds undergo metabolic degradation in the liver, half of which is excreted via kidneys and half via the hepatobiliary route [58]. Rivaroxaban is metabolized by several CYP isoforms, namely CYP3A4, CYP2J2 and CYP2C8, as well as by via CYP-independent mechanisms and has a major non active metabolite, M1 [25]. Hence, patients with hepatic dysfunction may exhibit a decreased rivaroxaban biotransformation and caution must be taken. Furthermore, a wide variety of drugs is metabolized via CYP which causes rivaroxaban to easily develop drug-drug interactions. Indeed, the potential for drug-drug interactions involving CYP3A4 has been comprehensively investigated for rivaroxaban. *In vitro* and *in vivo* studies indicated that the co-administration of drugs that are potent inhibitors of CYP3A4 leads to clinically relevant increases in rivaroxaban plasma concentrations. Consequently, it was recommended to avoid the administration of rivaroxaban to patients receiving concomitant systemic treatment with such drugs including azole antimycotics (such as ketoconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole) and HIV protease inhibitors such as ritonavir. Additionally, rifampicin and other strong CYP3A4 inducers, such as phenytoin, carbamazepine, phenobarbital and St John's Wort, must be co-administered with rivaroxaban with caution, highlighting the importance of monitoring the plasma concentrations of rivaroxaban [62].

Systemic clearance of rivaroxaban is low, 10 L h<sup>-1</sup>, and its elimination half-life is 5-9 h in young healthy people, although it increases in patients with at least 75 years old (11-13 h) [25,52,53]. Similarly to dabigatran, rivaroxaban dose is recommended to be reduced in patients with CrCl values between 15 and 50 mL min<sup>-1</sup>. However, in opposition to dabigatran, rivaroxaban is contraindicated in patients with CrCl < 15 mL min<sup>-1</sup>, particularly because unlike dabigatran, rivaroxaban is not dialyzable due to its high affinity for plasma proteins [63]. Identically to other DOACs, rivaroxaban is a P-gp substrate. P-gp not only decreases the passage of DOACs across biological membranes but can also influence their renal clearance. It is worthy of note that many of the drugs used in the treatment of atrial

fibrillation are P-gp inhibitors namely verapamil, dronedarone, amiodarone and quinidine [64]. Thus, co-administration with these drugs may increase rivaroxaban plasma concentration. Nonetheless, it was noted that single inhibitors of CYP or P-gp do not produce such a striking effect as inhibitors of both [58].

A recent case study aimed to assess the concentration of rivaroxaban in the breast milk of a single woman in the beginning of the lactation period. It showed that rivaroxaban was able to pass into breast milk but conclusions regarding the infant's exposure cannot be drawn based on a single case and without assessing the infant's plasma or urine rivaroxaban concentrations [65].

### c) Apixaban

The physicochemical properties of apixaban show that it has no ionizable groups and hence its water-solubility is independent of environmental pH [26]. Therefore, it can be co-administered with food and other drugs that can influence the pH. Moreover, apixaban seems to be absorbed mainly in the upper gastrointestinal tract, proximal to the colon, like other DOACs. Apixaban has a moderate bioavailability (66%, **Annex 2**) and it is administered in the dose of 5 mg twice-day in SPAF and 2.5 mg in VTE [25,27].

In contrast to its moderate bioavailability, apixaban shows a low apparent volume of distribution primarily due to its low extravascular distribution and high plasma binding (around 87%, **Annex 2**) [63]. Wang *et al.* assessed apixaban distribution in rats after a single oral dose; extensive tissue distribution was observed in male, female and pregnant rats. Nonetheless, transport to the brain and fetal tissues was limited [66]. These results suggest that efflux transporters may play a determinant role in the disposition of apixaban. Indeed, later Zhang *et al.* confirmed the involvement of P-gp and BCRP in the pharmacokinetics of apixaban by means of an *in vitro* permeability study using human P-gp- and BCRP-cDNA-transfected cells and Caco-2 cells [67]. However, it currently remains undefined whether these findings are also relevant in humans.

Although it is metabolized by CYP3A4 and in a less extent by CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, and CYP2J2, apixaban has low potential to interact with other drugs. This is not only because it has a low capacity for inhibiting or inducing CYPs, but also because several alternative metabolic routes can compensate its lack of CYP3A4-mediated metabolism [25,52]. Only 25% of apixaban is eliminated by renal excretion, while the

remaining portion is eliminated by a hepatic and fecal mechanism. Therefore, approximately 25% is excreted as metabolites [52]. The primary metabolite produced during its metabolism, *O*-demethyl apixaban sulphate, is non-reactive, which demonstrates the low potential to form reactive metabolites [68]. Both aforementioned factors render apixaban less susceptible to interact with other drugs due to its low interaction with CYP. Nonetheless, nonclinical studies demonstrated an increase in apixaban exposure of approximately 2-fold when co-administered with ketoconazole (a strong CYP3A4 and P-gp inhibitor), thus the co-administration of the two is not recommended [69]. Moreover, intrinsic factors such as gender, age and body weight influence the systemic exposure of apixaban, with females, elderly and patients with less than 50 kg demonstrating an increment of 30% of its systemic exposure [70]. Taking into account the multifactorial metabolism, apixaban seems to be a better option for patients with renal and/or hepatic impairment [25]. In fact, it was agreed that no dose adjustment is required in patients with mild and moderate hepatic or renal impairment [70].

#### d) Edoxaban

Edoxaban is characterized by a low solubility between pH 3 and 7, which may be the reason for its limited bioavailability (**Annex 2**) [71]. Consequently, in accordance to the Biopharmaceutics Classification System, edoxaban is classified as a member of class IV [71].

In healthy patients, edoxaban exhibits linear pharmacokinetics and has an expected degree of anticoagulation in doses up to 120 mg [72]. Moreover, it is recommended in a dose of 60 mg once daily, where approximately 80% of the dose is absorbed in the upper gastrointestinal tract [71,73]. Its peak concentrations are reached after 1-2 h after oral administration and are not affected by co-administration with food [71,74]. Despite its moderate bioavailability and fast absorption, edoxaban seems to have a greater volume of distribution in steady-state ( $VD_{ss}$ ) when compared with other DOACs ( $107 \pm 19.9$  L) and a low percentage of protein binding (55%) [63,71].

Edoxaban follows a biphasic elimination with an elimination half-life of about 10-14 h and is eliminated without major alterations [71]. One third is eliminated via kidneys, probably involving active secretion, and the remaining part via feces [75]. Additionally, three major metabolites from the biotransformation of edoxaban are reported, namely M1, M4 and M6 [75]. The main metabolite circulating in patients treated with edoxaban, M4, which is

formed by hydrolysis, seems to have pharmacological activity similar to that of edoxaban [75]. As the kidneys contribute with a great percentage of the elimination of edoxaban it is expected that the exposures of edoxaban and its metabolite M4 are increased in cases of renal impairment. Therefore, renal function should be assessed prior to treatment with edoxaban because in some cases, such as in patients with  $\text{CrCl} < 50 \text{ mL min}^{-1}$  adjustments may be required [63]. On the other hand, in patients with mild to moderate hepatic impairment, differences in the exposure of edoxaban were not clinically relevant [76].

Edoxaban has a minimal inhibitory effect on CYP isoenzymes and, thus, a minimal drug-drug interaction potential is expected [71]. However, edoxaban is a P-gp substrate and, consequently, its exposure seems to be affected by co-administration with other P-gp substrates/inhibitors. Mendel *et al.* assessed edoxaban exposure when co-administered with other six cardiovascular drugs that are likely to be administered concomitantly [77]. Only three (verapamil, quinidine and dronedarone) were considered to have the potential to clinically affect edoxaban exposure, when a total exposure of more than 50% was observed. Therefore, a reduction of 50% of the dose is recommended when edoxaban is administered with one or more of those drugs [77].

#### e) **Betrixaban**

Betrixaban is the most recent DOAC approved by the FDA and the one that exhibits a more distinct pharmacokinetic profile among the other DOACs. It is currently recommended on a dose of 80 mg once daily for extended prophylaxis of VTE in acute medically ill patients. Following an oral administration, absorption is fast and peak plasma concentrations are attained 3-4 h after [78,79]. Its oral bioavailability is about 34% and can be reduced when taken with food. Nonetheless, it is recommended to administer betrixaban with food in order to avoid an excessive anticoagulant effect [2,78,79]. Betrixaban binds to plasma proteins in small extent (only 60%) and exhibits a low peak/trough ratio, which enables a consistent anticoagulant effect over 24 h [78]. In addition to its terminal elimination half-life of 37 h, betrixaban exhibits a pharmacodynamics half-life of around 20 h, rendering it ideal for a once-daily administration [79].

Another main advantage of betrixaban is that it is almost non-metabolized by CYP enzymes (approximately 1%), rendering it less susceptible to interact with other drugs that interact with CYP enzymes. Instead, it is mostly metabolized by hydrolysis, forming two

major inactive metabolites [2,80]. Another important advantage of betrixaban is that it is almost not excreted by renal route (less than 8%), while almost 85% is excreted via hepatobiliary route as unaltered drug. However, importantly, its elimination is mediated by P-gp and, hence, co-administration with P-gp inhibitors may compromise this process, leading to its accumulation and possible toxicity [2,79]. Information regarding the interaction of betrixaban with P-gp inducers is reduced but it is expected to decrease betrixaban plasma concentration [78]. On the other hand, the P-gp substrate, digoxin, did not influence plasma concentration of betrixaban [78]. Despite being excreted to a lesser extent by renal pathways, dose reduction is recommended in patients with CrCl between 15-29 mL min<sup>-1</sup> as well as in patients treated with P-gp inhibitors [2].

#### **4. Chromatographic methods for the determination of DOACs**

Since DOACs have emerged in the last decade and their pharmacologic effects are undoubtedly correlated with plasma concentrations, the development of analytical techniques for their quantification in biological samples is increasing. Particularly regarding humans, new-found clinical data recommend employing plasma and pharmacokinetics monitoring of DOACs whenever possible, at least in special populations. This appeals for a personalized pharmacotherapy and consequently demands for accurate and sensitive analytical techniques [13,14]. This unmet clinical need has prompted the development and validation of several liquid chromatography methods for a routine determination of those anticoagulant drugs in body fluids with accuracy, precision and reproducibility. Liquid chromatography techniques have become important tools not only to support the therapeutic drug monitoring of DOACs, but also during non-clinical and clinical drug development as well as during quality control of pharmaceutical formulations. Indeed, other techniques are available to assess the anticoagulant activity of DOACs such as specific coagulation assays (dilute thrombin time and calibrated chromogenic anti-Xa assays) [81]. Nonetheless, these techniques have poor sensitivity and are not accurate enough when concerning the required low plasma concentrations. Bearing these limitations in mind, high resolution analytical techniques such as HPLC and UHPLC coupled to MS/MS or UV detectors have been considered as the best strategy to accurately assess the concentrations of DOACs in biological samples.



Therefore, the main focus of the present section is to provide insightful information on the bioanalytical techniques available in literature, in order to facilitate the development of improved methods for the quantification of DOACs. Special attention will be given to the most critical steps of chromatographic techniques including sample preparation, chromatographic conditions and DOACs stability.

### a) Sample preparation

Human biological specimens, also named human biospecimens, often include blood, plasma and urine, collected during pharmacokinetic monitoring procedures and clinical or epidemiological studies. In addition, blood/plasma and tissue homogenates collected from animals from basic or pre-clinical studies, must also be analyzed. However, the majority of the validated HPLC techniques to quantify DOACs was developed in plasma and urine samples from humans (**Annex 3**). These biological samples, particularly the former, are complex and contain endogenous substances (e.g. salts, acids, basis, proteins, cells and lipids) that interfere with chromatographic detection and maintenance of the HPLC apparatus. Urine is a cleaner sample, but often requires dilution prior to chromatographic analysis. Therefore, adequate bioanalytical procedures must be firstly applied in order to remove endogenous compounds and isolate/concentrate the analytes of interest.

Several methodologies have been used to minimize chromatographic interferences and avoid column deterioration and clogging (**Annex 3**) [82]. Conventionally, sample preparation has been performed by means of protein precipitation (PP), liquid-liquid extraction (LLE) or solid-phase extraction (SPE), but several modern approaches such as solid-phase microextraction (SPME), liquid-liquid microextraction (LLME), microextraction by packed sorbent (MEPS), molecularly imprinted polymers (MIP) are currently being used. To select the most adequate sample preparation methodology, it is important to take into account the specific goal of the investigation, the type of biological matrix and the physicochemical characteristics of the DOAC described in **Section 2**.

Analyzing **Annex 3**, the most commonly reported sample preparation techniques for the extraction of DOACs from biological matrices and subsequent chromatographic analysis were PP and SPE probably because of their simplicity and high reproducibility and ease automatization, respectively.

PP is the simplest technique applied throughout sample preparation protocols and it is advantageous since it is rapid, easy to apply and does not require expensive materials or solvents. Nonetheless, PP is a clean-up process rather than an extraction procedure, and consequently several interferences may remain in the sample, co-eluting with analytes and compromising their accurate and precise quantification. Furthermore, analytes concentration is unenforceable, increasing the lower limit of quantification (LLOQ) and decreasing method sensitivity. Specifically for DOACs, PP seems to be mostly selected when tandem mass spectrometry (MS/MS) detection is used (**Annex 4**). Indeed, co-elution of endogenous compounds with DOACs may not be critical in chromatographic techniques with MS/MS detection because of the high sensitivity of MS/MS detectors which can distinguish distinct compounds at the same retention time. However, when UV-Vis or diode-array detectors (DAD) are employed, interferences may influence analyte determination if they have the same retention time. Furthermore, recovery rates obtained with PP combined with MS/MS detection were consistent and significant, ranging from 77.3% to 104.6% for rivaroxaban [34,36,41,42,44,83-85], 81.9% to 104% for apixaban [41,42,44,84], 81.9% to 100% for edoxaban [41,44] and 73% to 105.6% for dabigatran [36,42,44,69,84,85] (**Annex 3**).

PP techniques consisted on the addition of a precipitating agent, mainly methanol or acetonitrile, followed by vortexing and centrifugation. Derogis *et al.* also filtered the sample through a 0.22  $\mu\text{m}$  polyvinylidene difluorid (PVDF) filter after PP to remove eventual suspended microparticles, achieving a recovery rate of rivaroxaban higher than 95.2% [34]. This is an important strategy to protect chromatographic column and it is applicable to DOACs as they do not interact with PVDF filters, presenting a small non-specific binding percentage. Moreover, Saffian *et al.* achieved recovery rates from 98% to 104.9% for dabigatran when centrifuging a mixture of water with the PP supernatant in a 96-well plate [37]. PP in 96-well format was also proposed by Li *et al.* [38]. Accordingly, samples were added to the plates and methanol was used to precipitate the proteins. Afterwards, the plates were capped and vortexed, followed by centrifugation to remove any precipitated material. The supernatant was transferred to another 96-well filtration plate and placed in the 96-well manifold, where plasma samples were filtered by vacuum. This method is fast and enables automatization, being therefore extremely useful for high throughput non-clinical assays but also in hospitals, where DOACs concentrations in patients' plasma are often required in emergent clinical situations.

It is important to highlight that a considerable number of PP methodologies employed

to quantify rivaroxaban required acidification of the medium (e.g. formic acid at 50% [35], HCl 0.1 N [36,85]) before the addition of the precipitating agent (**Annex 3**). This strategy results from the fact that rivaroxaban has a high affinity to proteins and thus acidification of the medium is expected to be useful and break the drug-protein binding, increasing DOAC recovery rates.

Although SPE has been less applied than PP (**Annex 3**), it results in cleaner samples as it takes advantage of different affinities of the analytes and interferences for the solid-phase (i.e. sorbent). It typically requires three essential steps to successfully extract the analyte of interest without major interferences. The first step, named conditioning step, may not be required in some of the newest SPE cartridges as it consists in activating the sorbent and ensure a reproducible retention of the analyte(s). Afterwards, the sample is loaded and washed to eliminate interfering compounds, followed by an elution step with organic solvents to collect the analyte(s) of interest. Two types of SPE cartridges have been applied to extract DOACs from plasma samples. One is packed with a polymeric-based sorbent and the other with a silica-based sorbent. The reversed phase cartridge packed with polymeric sorbent is able to retain neutral, acid and basic compounds by different mechanisms such as pi-pi bonding, hydrogen bonding and hydrophobic interactions. On the other hand, silica-based cartridges are usually packed with non-polar sorbents that have a broad spectrum of drug retention. According to **Annex 3**, the most frequently used solvents in the conditioning step include methanol followed by water in different proportions and, in some cases, ammonium acetate or borate buffer were used for pH adjustment to the value of 9. For the washing step, the diversity of employed reagents was wider. For instance, Çelebier *et al.* used a mixture of water and methanol with the addition of 3 mL of borate buffer (pH 9.0, 0.2 M) while Pursley *et al.* used a mixture of water and methanol with 5 mM ammonium acetate (10:90, v/v) [33,40]. In opposition, Baldelli *et al.* only used water [43]. However, it is unanimous that an aqueous solvent should be used during sample washing [86] and, independently of the DOAC that is considered, pH adjustment during SPE is not mandatory. Indeed, combining the information compiled in **Annexes 3 and 4**, the majority of the SPE procedures that used salts, acids and pH adjustment also employed mobile phase with similar qualitative and quantitative composition. In opposition, elution is more similar amongst the several methodologies, and it is performed with organic solvents, with methanol emerging as the preferred solvent for eluting DOACs. Two of the most important advantages observed

on using SPE procedures are their high recovery rates (**Annex 3**) as well as their high reproducibility given by variation coefficients lower than 15%.

Interestingly, instead of applying the typical SPE technique for the extraction of DOACs, Foerster *et al.* employed the  $\mu$ Elution technique which is starting to gain more audience once it is easily scaled up to automation and due to its high throughput. For this purpose, an  $\mu$ Elution Prime HLB 96-well cartridge was used and the recovery rates ranged from 85.5% to 93.1% for apixaban, 80.6% to 84.8% for dabigatran, 98.9% to 100.9% for edoxaban and 101.6% to 104.2% for rivaroxaban [39].

Importantly, Hanada *et al.* compared two different methods to prepare human plasma samples before the quantification of edoxaban (PP versus LLE). The PP technique was employed with 0.2 or 0.4 mL of acetonitrile as precipitating agent [87]. Recovery rates showed that co-precipitation of edoxaban with proteins could be avoided using higher volumes of acetonitrile, given that recovery rates improved as the volume increased. Regarding the LLE procedure, diethyl ether under alkaline conditions (0.5 mL of borate buffer, pH 10) was used to extract edoxaban. The organic layer was transferred to a tube and the solvent was then evaporated. LLE has the same basis of SPE but takes advantage of different affinities for two different liquid phases. Recovery rates achieved with this technique were of 50%, suggesting that LLE is not the best option for the extraction of edoxaban from plasma [87].

Wiesen *et al.* conducted a study that compared PP with a new technique using commercial paramagnetic microparticles followed by magnetic depletion. The latter could be an advantageous technique since it is suitable for automation [27]. Nevertheless, the recovery rates of both methods were similar (69.1% to 102.7% with PP and 84.2% to 103.2% with magnetic beads). Hence, as the alternative method was more expensive and more difficult to apply, it may not be the best choice for analysis in smaller laboratories or hospitals.

More recently, several microextraction methodologies have been developed in order to overcome the principal limitations of SPE, which is typically considered the most time-consuming, labor-intensive and error-prone part of the bioanalytical workflow. Among those novelties, MEPS represents an outstanding approach for sample preparation and preconcentration of target analytes from biological matrices. Regarding DOACs, MEPS was employed only to pre-treat urine samples and extract rivaroxaban [28]. This is a simple and fast technique advisable due to its benefits compared to other well-known techniques (e.g.

smaller volumes of sorbents and samples are required) [29]. It is characterized by using a packing material directly coupled to a syringe, while in the conventional SPE technique the packing material is incorporated into a separate column/cartridge. In both procedures, the sample preparation/extraction occurs on the solid packed sorbent and the underlying principles are the same. The major difference regards on the fact that SPE cartridge can only be used once and MEPS can be reused from 10 to 300 times, making it more economical. Nevertheless, MEPS technique requires an additional and careful sorbent washing step after analytes elution in order to eliminate or reduce the carryover effect, enabling the reliable reuse of MEPS sorbent [29]. Taking into account the aforementioned advantages of MEPS and its wide employment in drug analysis of biological samples, it is expected that it can be well-succeeded and used in a near future to extract DOACs from other biological samples besides urine.

#### **b) Stability and storage of DOACs**

Information regarding the stability of DOACs is useful to ensure the reliability of the bioanalysis. Therefore, it is important to gather as much information as possible regarding the stability of compounds in all storage and sample handling conditions. Drug stability is mostly affected by matrix type, storage temperature and storage time. Although most studies only assessed stability in plasma, different times and temperatures of storage were employed. The stability assessment of DOACs mainly comprised long-term and short-term stability as well as stability after sample processing. In addition, some studies investigated the influence of freeze–thaw cycles and concluded that apixaban, rivaroxaban and dabigatran were stable after three freeze-thaw cycles when stored at -80 °C, and that edoxaban was stable after three freeze-thaw cycles when stored at -20 °C [32,41-43].

Considering the long-term stability in human plasma, all DOACs appeared to be stable for at least one month when stored at -20 °C [27,28,32-34,87]. Furthermore, prolonged stability was reported at -80 °C: dabigatran was stable for one year, rivaroxaban for eight months and edoxaban for five months [27,34,37,81,87].

Recent studies suggest some concerns regarding the short-term stability in human plasma of edoxaban. In fact, Lindahl et al registered a decreased of 17% of edoxaban after serum samples transportation and storage for 24 h at 30°C, increasing to more than 30% and 49%, after 48 h and 72 h, respectively [88]. The authors suggest that edoxaban is only

stable in serum samples at 30 °C during 6 h. Similarly, Wiesen *et al.* also registered a significant decrease of edoxaban plasma concentrations after seven days of storage at room temperature, ranging a decrease between 69.4-83.1% of the concentration found in fresh samples [27]. In opposition, the remaining DOACs appear to be stable in human plasma samples at room temperature for at least seven days [27,32,33-38,43,85]. Specifically regarding rat plasma matrix, it was demonstrated that rivaroxaban, edoxaban and apixaban are stable at room temperature for at least 3 h and at -20 °C for 35 days [38,41,89].

Regarding long-term stability, edoxaban also revealed not to be stable at temperatures above -25 °C for five weeks, suggesting that if the analyte is unknown and samples must be stored for more than one week, plasma DOAC samples should be frozen at temperatures equal to or lower than -25 °C [39]. Nonetheless, rivaroxaban and dabigatran seem to be stable at room temperature for at least 2 h while apixaban remained stable for 24 h [37,40].

Although some studies developed and validated HPLC techniques to quantify DOACs in urine, only one study assessed the stability of rivaroxaban in urine, suggesting that less than 15% of the DOAC is lost when human urine is storage at -20 °C [28].

Regarding the stability of each DOAC in stock solutions, rivaroxaban was stable at room temperature for 24 h and for one month at 4 °C, when prepared in a mixture of acetonitrile and water (80:20) and for five months at temperatures lower than -80 °C, when prepared in acetonitrile [30,83]. In addition dabigatran, seems to be stable at -20 °C for 20 days and at 2-8 °C for 15 h in a methanolic solution [38,69] while apixaban seems to be stable during 531 days at -20 °C and during 22 h at room temperature also when dissolved in methanol [40].

Up to date, the stability of processed samples was investigated only for rivaroxaban and dabigatran and after PP with methanol, demonstrating that they were stable, respectively, at 9 °C for seven days and at room temperature for 24 h [38,83].

According to the information herein presented, DOACs seem to be relatively stable under different conditions. However, some concern has been given to the stability of dabigatran etexilate, which appears to be reduced to 50% of its original value after 24 h of storage at room temperature, and to edoxaban that appears to be unstable in several experimental conditions [27,32,39,88]. Furthermore, little information regarding betrixaban was found and therefore caution must be taken when storing plasma samples with this DOAC, opting for lower temperatures whenever possible.

## c) Chromatographic conditions

### 1) Internal standard

When handling biological samples, complex sample preparation steps are often required, involving a multistep sample preparation which increases the probability of systematic or random errors like volumetric losses. Furthermore, these errors may also occur during the chromatographic analysis. Therefore, in order to compensate these errors, an internal standard (IS) should be added at known concentrations, at the beginning of sample processing. The choice of the most suitable IS is critical to attain an accurate and precise method. In theory, the IS should have similar physicochemical characteristics to the analyte, and, hence, similar extraction and elution behaviors to those of DOACs. Nonetheless, it must have a different retention time of the remaining analytes (except when using MS/MS detection), needs to be stable during the procedure and must be absent from the natural sample.

Regarding the analytical techniques developed and validated to quantify DOACs in biological samples, stable-isotope labeled IS has been often used especially with MS/MS detectors (**Annex 4**) [36,40,41,44,83,84,90]. As they have a similar behavior towards ionization compared to the unlabeled analyte, they provide better accuracy and precision. In fact, only MS/MS is able to distinguish between the analyte and its isotope labeled analogue because of their different fragmentation patterns. Stable-isotope labeled ISs seem to yield better assay performances than analogous IS, however they are not always available, probably because they are very expensive and require special handling conditions.

As observed in **Annex 4**, besides isotope labeled DOACs, other IS can be employed such as diazepam, carvedilol, sertraline, paclitaxel, risperidone and ticlopidine in spite of not presenting a similar chemical structure to those of DOACs. When UV-Vis or DAD is employed, isotope labeled DOACs cannot be used, and caffeine and prednisolone were selected as the preferable IS [30,33]. It is important to emphasize that if a patient is co-administered with one of these drugs/xenobiotics, the technique cannot be used to quantify the DOAC, as the IS peak area will be overrepresented.

## II) Chromatographic column

Chromatographic analysis of biological samples performed to determine the existing concentration of DOACs is mainly achieved by high resolution analytical techniques namely HPLC and UHPLC, although there is one example of turbulent flow liquid chromatography (**Annex 4**) [42]. This technique does not require sample preparation, reducing the analysis time and it is executed by using high flow rates and large particle size stationary phases [91].

HPLC is ascribed as the gold standard separation technique, being worldwide utilized in pharmaceutical industry and academic research laboratories, mainly due to the robustness, good selectivity and sensitivity achieved when coupled to MS/MS, DAD or fluorescence detectors [85]. With the aim of reducing the runtime and improving the efficiency of HPLC techniques, advanced alternative methodologies emerged, namely UHPLC, which has the same principles of HPLC, but enables faster and more efficient separations. In fact, this system requires shorter chromatographic columns packed with particles with a size below 2.0  $\mu\text{m}$ , thus inducing an optimal velocity and mass transfer. UHPLC columns are packed with a bridged ethyl hybrid (BEH) technology, responsible for an increase in mechanical resistance [92]. Monolithic supports consisting of a single rod of porous material, such as silica and carbon, with a bimodal pore distribution have been used to improve the efficiency of HPLC, instead of stationary mobile phases with smaller particle sizes. Such column types have lower back pressures, leading to a higher efficiency. For instance, a monolithic column was employed to successfully separate apixaban and its major metabolite, BMS-562247, in only 3 minutes and presented a calibration range that included the DOAC therapeutic range [40].

Despite the wide variety of columns currently available in the market, reversed-phase columns, including C18 and C8, were the most frequently utilized to separate DOACs and quantify them in biological samples (**Annex 4**). C18 columns appear to be preferable to quantify DOACs than C8, probably because long alkyl chains seem to be more efficient in the separation of non-polar compounds, while shorter alkyl chains are preferable for separation of polar compounds [83]. Furthermore C18 columns are more sterically hindered at the silica surface than C8 columns and have a higher surface area to interact with the compounds. Consequently, by increasing the time of interaction between the analyte and the stationary phase, the retention time is increased but better resolution is also achieved.



### III) Mobile phase

As mentioned in **Section 2**, the retention time of the analytes depends not only on their pKa but also on the pH of the mobile phase. These two parameters will determine the ionization degree of the analyte and its affinity to stationary and mobile phases. In this regard, depending on their pKa value and pH of the mobile phase, the analyte may be in different charge forms and exhibit different chromatographic behaviors. Therefore, extra care must be taken regarding the final pH of the mobile phase before performing the chromatographic analysis, since it can influence the retention times and the shape of the peaks.

Indeed, analyzing **Annex 4**, almost all techniques have employed an ion-pairing agent in the mobile phase, including formic acid [69,84], ammonium formate [85] or ortho-phosphoric acid [31] to adjust the pH of the mobile phase to a final value of 3. As the compounds have pKa values higher than this pH value, they are expected to be mainly in their non-ionized form and therefore interact more with the stationary phase, exhibiting peaks with better resolution. As it is shown in **Annex 4**, both gradient and isocratic elutions were utilized with different proportions of organic and aqueous solvent. The most commonly utilized organic solvent was acetonitrile, although in some cases, methanol was preferred. For instance, Çelebier *et al.* tested the solubility of rivaroxaban in different organic solvents while developing a method for its quantification in dosage forms. It was concluded that rivaroxaban was clearly soluble in acetonitrile and thus, a mixture of acetonitrile and water (55:45, v/v) was used as mobile phase in an isocratic elution [30]. Moreover, it seems that earlier and sharper peaks are obtained when utilizing a gradient elution with an aqueous 5 mM ammonium formate solution and acetonitrile [39].

#### d) Detection mode

Since the therapeutic ranges of DOACs are not yet well defined, a method able to quantify a wide range of concentrations is desirable. It would allow the measurement of values over and above the expected plasma concentrations, which could be useful to identify treatment failures or overdoses [94].

UV detection is one of the least expensive detection systems in the market and, therefore, it is the method of choice when analyzing compounds with high UV absorption.

Nonetheless, these systems have poor selectivity and require appropriate extraction procedures to eliminate endogenous interferences that often absorb on UV-Vis. As evidenced in **Annex 4**, UV detection has been less used to assess DOACs plasma concentrations, but it seems to be the preferable choice when assessing the concentration of DOACs in tablets, probably because these matrices are originally cleaner and the concentrations of DOACs are higher than those achieved in plasma [30,31]. UV detection can be performed by using an HPLC-UV or an HPLC-DAD system, with the second considered preferable because it enables the scan of a range of multiple wavelengths, while UV can only scan a single wavelength at a time.

Regarding MS/MS detection, it is undeniably the detection system of choice to quantify DOACs in biological samples, offering a high sensitivity that translates into the reduced LLOQ values depicted in **Annex 4**. Mass spectrometry utilizes mass-to-charge ratios to directly quantify the analyte, which allows a greater selectivity and sensitivity [27]. MS/MS differs from MS detection, once it involves two quadrupole analyzers. This allows the scan of both molecular ion and product ions produced by its disintegration, leading to an increase of specificity [95].

As summarized in **Annex 4**, almost all the techniques developed up to date utilized MS/MS. The analytes were always positively ionized by electrospray ionization (ESI) and its quantification was performed by multiple reaction monitoring (MRM). On the other hand, UV detection was only employed four times and none included edoxaban. The absorption maxima were 249 nm, 294 nm and 280 nm for rivaroxaban, dabigatran and apixaban respectively.

Schwertner and Stankus left an open door for the use of fluorescence detection for the quantification of dabigatran. In their study, the spectra of dabigatran and its prodrug were characterized, where dabigatran had an excitation and emission maxima of  $310 \pm 10$  and  $375 \pm 10$  nm, respectively [96]. Despite the good outcomes of this study, further validation is needed in order to utilize this technique in clinical practice.

## 5. Conclusion

Plasma and pharmacokinetic monitoring of DOACs is becoming imminent in some clinical cases, not only because they are the first-line drugs in atrial fibrillation and VTE but also because, in spite of being used, the prevalence rate of strokes is increasing. Moreover, as all DOACs interact with ABC transporters, namely P-gp and BCRP and are metabolized by polymorphic CYP enzymes, it is necessary to assess whether concomitant administration with substrates of these enzymes interfere in DOAC's pharmacokinetic profile or not. Nevertheless, tests that accurately and quickly assess plasma concentrations of DOACs are currently lacking in clinical practice.

Therefore, the analytical methods up to day developed to quantify DOACs in different biological matrices were herein compared. HPLC and UHPLC with MS/MS detection appeared to be the gold standard instrumentation for the quantification of DOACs in plasma samples. With high sensitivity and high selectivity, those methodologies rarely required laborious sample treatment procedures. Indeed, PP was the most commonly employed technique, followed by SPE and new emerging techniques such as MEPS and  $\mu$ Elution. Distinct tactics of optimization these procedures were herein highlighted, with the expectation of being consulted as an informative tool to assist the optimization of new analytical methods for the quantification of DOACs.

## References

- [1]. VERHEUGT, F.W.A. and GRANGER, C. B. **Oral anticoagulants for stroke prevention in atrial fibrillation: Current status, special situations, and unmet needs.** *Lancet*, 386 (2015) 303–310.
- [2]. DOBESH, P. P. and TREVARROW, B. J. **Betrixaban: Safely Reducing Venous Thromboembolic Events with Extended Prophylaxis.** *Am. J. Med.*, 132 (2019) 307–311.
- [3]. RUFF, C. T., GIUGLIANO, R. P., BRAUNWALD, E., HOFFMAN, E. B., DEENADAYALU, N., EZEKOWITZ, M. D., CAMM, A. J., WEITZ, J. I., LEWIS, B. S., PARKHOMENKO, A., YAMASHITA, T. and ANTMAN, E. M. **Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: A meta-analysis of randomised trials.** *Lancet*, 383 (2014) 955–962.
- [4]. REILLY, P.A., LEHR, T., HAERTTER, S., CONNOLLY, S. J., YUSUF, S., EIKELBOOM, J.W., EZEKOWITZ, M. D., NEHMIZ, G., WANG, S. and WALLENTIN, L. **The effect of dabigatran plasma concentrations and patient characteristics on the frequency of ischemic stroke and major bleeding in atrial fibrillation patients: The RE-LY trial (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy).** *J. Am. Coll. Cardiol.*, 63 (2014) 321–328.
- [5]. RODRIGUEZ, R. A., CARRIER, M. and WELLS, P. S. **Non-adherence to new oral anticoagulants: A reason for concern during long-term anticoagulation?** *J. Thromb. Haemost.*, 11 (2013) 390–394.
- [6]. DI MINNO, A., FRIGERIO, B., SPADARELLA, G., RAVANI, A., SANSARO, D., AMATO, M., KITZMILLER, J. P., PEPI, M., TREMOLI, E. and BALDASSARRE, D. **Old and new oral anticoagulants: Food, herbal medicines and drug interactions.** *Blood Rev.*, 31 (2017) 193–203.
- [7]. MARGELIDON-COZZOLINO, V., HODIN, S., JACQUEROUX, E., DELÉZAY, O., BERTOLETTI, L. and DELAVENNE, X. **In vitro assessment of pharmacokinetic drug-drug interactions of direct oral anticoagulants: Type 5-phosphodiesterase inhibitors are inhibitors of rivaroxaban and apixaban efflux by P-glycoprotein.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 365 (2018) 519–525.
- [8]. HODIN, S., BASSET, T., JACQUEROUX, E., DELEZAY, O., CLOTAGATIDE, A., PEREK, N., MISMETTI, P. and DELAVENNE, X. **In Vitro Comparison of the Role of P-Glycoprotein and Breast**

**Cancer Resistance Protein on Direct Oral Anticoagulants Disposition.** Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 43 (2018) 183–191.

[9]. GOUIN-THIBAUT, I., DELAVENNE, X., BLANCHARD, A., SIGURET, V., SALEM, J. E., NARJOZ, C., GAUSSEM, P., BEAUNE, P., FUNCK-BRENTANO, C., AZIZI, M., MISMETTI, P. and LORIOT, M. A. **Interindividual variability in dabigatran and rivaroxaban exposure: contribution of ABCB1 genetic polymorphisms and interaction with clarithromycin.** J. Thromb. Haemost., 15 (2017) 273–283.

[10]. BUCKLEY, L. F., RYBAK, E., ALDEMERDASH, A., CHENG, J. W. M. and FANIKOS, J. **Direct oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation and renal impairment, extremes in weight, or advanced age.** Clin. Cardiol., 40 (2017) 46–52.

[11]. ANDREU CAYUELAS, J. M., CARO MARTÍNEZ, C., FLORES BLANCO, P. J., ELVIRA RUIZ, G., ALBENDIN IGLESIAS, H., CEREZO MANCHADO, J. J., BAILEN LORENZO, J. L., JANUZZI, J. L., GARCÍA ALBEROLA, A. and MANZANO-FERNÁNDEZ, S. **Kidney function monitoring and nonvitamin K oral anticoagulant dosage in atrial fibrillation.** Eur. J. Clin. Invest., 48 (2018) 0–2.

[12]. SCHWARTZ, J. B. **Potential Effect of Substituting Estimated Glomerular Filtration Rate for Estimated Creatinine Clearance for Dosing of Direct Oral Anticoagulants.** J. Am. Geriatr. Soc., 64 (2016) 1996–2002.

[13]. PERNOD, G., ALBALADEJO, P., GODIER, A., SAMAMA, C. M., SUSEN, S., GRUEL, Y., BLAIS, N., FONTANA, P., COHEN, A., LLAU, J. V., ROSENCHER, N., SCHVED, J. F., DE MAISTRE, E., SAMAMA, M. M., MISMETTI, P. and SIÉ, P. **Prise en charge des complications hémorragiques graves et de la chirurgie en urgence chez les patients recevant un anticoagulant oral anti-IIa ou anti-Xa direct. Propositions du Groupe d'intérêt en Hémostase Périopératoire (GIHP) - mars 2013.** Ann. Fr. Anesth. Reanim., 32 (2013) 691–700.

[14]. GROTTKE, O., AISENBERG, J., BERNSTEIN, R., GOLDSTEIN, P., HUISMAN, M. V., JAMIESON, D. G., LEVY, J. H., POLLACK, C. V., SPYROPOULOS, A. C., STEINER, T., DEL ZOPPO, G. J. and EIKELBOOM, J. **Efficacy of prothrombin complex concentrates for the emergency reversal of dabigatran-induced anticoagulation.** Crit. Care, 20 (2016).

[15]. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem.** [Accessed: 9<sup>th</sup> October 2018]. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

[16]. DRUG BANK. **Drug Bank Database.** [Accessed 9<sup>th</sup> october 2018]. Available at: <https://www.drugbank.ca/>

- [17]. ChEMBL. **CHEMBL512351**. [Accessed 9<sup>th</sup> october 2018] Available at: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound/inspect/CHEMBL512351>
- [18]. REMKO, M. **Molecular structure, lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of novel anticoagulant agents**. J. Mol. Struct. THEOCHEM, 916 (2009) 76–85.
- [19]. REMKO, M., BROER, R. and REMKOVÁ, A. **A comparative study of the molecular structure, lipophilicity, solubility, acidity, absorption and polar surface area of coumarinic anticoagulants and direct thrombin inhibitors**. RSC Adv., 4 (2014) 8072–8084.
- [20]. REMKO, M., REMKOVÁ, A. and BROER, R. **Theoretical study of molecular structure and physicochemical properties of novel factor Xa inhibitors and dual factor XA and factor IIA inhibitors**. Molecules, 21 (2016).
- [21]. GONZALEZ-QUESADA, C.J. and GIUGLIANO, R. P. **Comparison of the phase III clinical trial designs of novel oral anticoagulants versus warfarin for the treatment of nonvalvular atrial fibrillation: Implications for clinical practice**. Am. J. Cardiovasc. Drugs, 14 (2014) 111–127.
- [22]. FORTUNA, A., ALVES, G., SOARES-DA-SILVA, P. and FALCÃO, A. **Pharmacokinetics, brain distribution and plasma protein binding of carbamazepine and nine derivatives: New set of data for predictive in silico ADME models**. Epilepsy Res., 107 (2013) 37–50.
- [23]. BICKER, J., ALVES, G., FORTUNA, A., SOARES-DA-SILVA, P. and FALCÃO, A. **A new PAMPA model using an in-house brain lipid extract for screening the blood-brain barrier permeability of drug candidates**. Int. J. Pharm., 501 (2016) 102–111.
- [24]. TETKO, I. V. and TANCHUK, V. Y. **Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program**. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 42 (2002) 1136–1145.
- [25]. B.I., E., D.J., Q. and J.I., W. **Comparative pharmacodynamics and pharmacokinetics of oral direct thrombin and factor Xa inhibitors in development**. Clin. Pharmacokinet., 48 (2009) 1–22.
- [26]. J., C. and J., A. **Apixaban, an oral direct Factor Xa inhibitor: Awaiting the verdict**. Expert Opin. Investig. Drugs, 17 (2008) 1937–1945.

- [27]. WIESEN, M. H. J., BLAICH, C., STREICHERT, T., MICHELS, G. and MÜLLER, C. **Paramagnetic micro-particles as a tool for rapid quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban and rivaroxaban in human plasma by UHPLC-MS/MS.** Clin. Chem. Lab. Med., 55 (2017) 1349–1359.
- [28]. MAGIERA, S. **Fast, simultaneous quantification of three novel cardiac drugs in human urine by MEPS-UHPLC-MS/MS for therapeutic drug monitoring.** J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci., 938 (2013) 86–95.
- [29]. ALVES, G., RODRIGUES, M., FORTUNA, A., FALCÃO, A. and QUEIROZ, J. **A critical review of microextraction by packed sorbent as a sample preparation approach in drug bioanalysis.** Bioanalysis, 5 (2013) 1409–1442.
- [30]. ÇELEBIER, M., REÇBER, T., KOÇAK, E. and ALTINÖZ, S. **RP-HPLC method development and validation for estimation of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms.** Brazilian J. Pharm. Sci., 49 (2013) 359–366.
- [31]. ZAHER, A. A. EL, KADY, E. F. EL, HOSSINI, O. M. EL and GHWAS, H. E. EL. **Development and Validation of Stability-Indicating RP-LC Method for the Determination of Dabigatran Etxilate Mesylate in Bulk and Pharmaceutical Formulations.** (2015) 402–408.
- [32]. BOEHR, S. and HAEN, E. **Development of an UHPLC-UV-Method for Quantification of Direct Oral Anticoagulants.** Ther. Drug Monit., 39 (2017) 66–76.
- [33]. ÇELEBIER, M., REÇBER, T., KOÇAK, E., ALTINÖZ, S. and KLR, S. **Determination of Rivaroxaban in Human Plasma by Solid-Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography.** J. Chromatogr. Sci., 54 (2016) 216–220.
- [34]. DEROGIS, P. B. M., SANCHES, L. R., ARANDA, V. F. DE, COLOMBINI, M. P., MANGUEIRA, C. L. P., KATZ, M., FAULHABER, A. C. L., MENDES, C. E. A., FERREIRA, C. E. D. S., FRANÇA, C. N. and DE GUERRA, J. C. C. **Determination of rivaroxaban in patient's plasma samples by anti-Xa chromogenic test associated to high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS).** PLoS One, 12 (2017) 1–14.
- [35]. IQBAL, M., KHALIL, N. Y., IMAM, F. and KHALID ANWER, M. **A validated high-throughput UHPLC-MS/MS assay for accurate determination of rivaroxaban in plasma sample.** J. Thromb. Thrombolysis, 39 (2015) 79–88.

- [36]. KOROSTELEV, M., BIHAN, K., FERREOL, L., TISSOT, N., HULOT, J. S., FUNCK-BRENTANO, C. and ZAHR, N. **Simultaneous determination of rivaroxaban and dabigatran levels in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 100 (2014) 230–235.
- [37]. SAFFIAN, S. M., ZHANG, M., LEONG CHIN, P. K. and JENSEN, B. P. **Quantification of dabigatran and indirect quantification of dabigatran acylglucuronides in human plasma by LC-MS/MS.** *Bioanalysis*, 7 (2015) 957–966.
- [38]. LI, J., FANG, J., ZHONG, F., LI, W., TANG, Y., XU, Y., MAO, S. and FAN, G. **Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of dabigatran etexilate, intermediate metabolite and dabigatran in 50µL rat plasma and its application to pharmacokinetic study.** *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 973 (2014) 110–119.
- [39]. FOERSTER, A. K. I., HUPPERTZ, A. and OLIVER, M. **Simultaneous quantification of direct oral anticoagulants currently used in anticoagulation therapy.** *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (2017) doi:10.1016/j.jpba.2017.10.011.)
- [40]. PURSLEY, J., SHEN, J. X., SCHUSTER, A., DANG, O. T., LEHMAN, J., BUONARATI, M. H., SONG, Y., AUBRY, A. F. and ARNOLD, M. E. **LC-MS/MS determination of apixaban (BMS-562247) and its major metabolite in human plasma: An application of polarity switching and monolithic HPLC column.** *Bioanalysis*, 6 (2014) 2071–2082.
- [41]. ZHANG, W. LI, LOU, D., ZHANG, D. TAO, ZHANG, Y. and HUANG, H. JIE. **Determination of rivaroxaban, apixaban and edoxaban in rat plasma by UPLC–MS/MS method.** *J. Thromb. Thrombolysis*, 42 (2016) 205–211.
- [42]. BLAICH, C., MÜLLER, C., MICHELS, G. and WIESEN, M. H. J. **Multi-analyte analysis of non-Vitamin K antagonist oral anticoagulants in human plasma using tandem mass spectrometry.** *Clin. Chem. Lab. Med.*, 53 (2015) 1981–1990.
- [43]. BALDELLI, S., CATTANEO, D., PIGNATELLI, P., PERRONE, V., PASTORI, D., RADICE, S., VIOLI, F. and CLEMENTI, E. **Validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of dabigatran, rivaroxaban and apixaban in human plasma.** *Bioanalysis*, 8 (2016) 275–283.
- [44]. GOUS, T., COUCHMAN, L., PATEL, J. P., PARADZAI, C., ARYA, R. and FLANAGAN, R. J. **Measurement of the direct oral anticoagulants apixaban, dabigatran, edoxaban,**



**and rivaroxaban in human plasma using turbulent flow liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry.** *Ther. Drug Monit.*, 36 (2014) 597–605.

[45]. BANSILAL, S., BLOOMGARDEN, Z., HALPERIN, J. L., HELLKAMP, A. S., LOKHNYGINA, Y., PATEL, M. R., BECKER, R. C., BREITHARDT, G., HACKE, W., HANKEY, G. J., NESSEL, C. C., SINGER, D. E., BERKOWITZ, S. D., PICCINI, J. P., MAHAFFEY, K. W. and FOX, K. A. A. **Efficacy and safety of rivaroxaban in patients with diabetes and nonvalvular atrial fibrillation: The Rivaroxaban Once-daily, Oral, Direct Factor Xa Inhibition Compared with Vitamin K Antagonism for Prevention of Stroke and Embolism Trial in Atrial Fibril.** *Am. Heart J.*, 170 (2015) 675-682.e8.

[46]. HYLEK, E. M., HELD, C., ALEXANDER, J. H., LOPES, R. D., DE CATERINA, R., WOJDYLA, D. M., HUBER, K., JANSKY, P., STEG, P. G., HANNA, M., THOMAS, L., WALLENTIN, L. and GRANGER, C. B. **Major bleeding in patients with atrial fibrillation receiving apixaban or warfarin: The ARISTOTLE trial (Apixaban for reduction in stroke and other thromboembolic events in atrial fibrillation): Predictors, characteristics, and clinical outcomes.** *J. Am. Coll. Cardiol.*, 63 (2014) 2141–2147.

[47]. RUFF, C. T., GIUGLIANO, R. P., ANTMAN, E. M., CRUGNALE, S. E., BOCANEGRA, T., MERCURI, M., HANYOK, J., PATEL, I., SHI, M., SALAZAR, D., MCCABE, C. H. and BRAUNWALD, E. **Evaluation of the novel factor Xa inhibitor edoxaban compared with warfarin in patients with atrial fibrillation: Design and rationale for the Effective aNticoaGulation with factor xA next GEneration in Atrial Fibrillation- Thrombolysis in Myocardial Infa.** *Am. Heart J.*, 160 (2010) 635-641.e2.

[48]. GOODMAN & GILMAN'S – **The Pharmacological Basis of Therapeutics.** 9<sup>th</sup> Edition. United States, 1996. ISBN 0-07-113348-8.

[49]. COHEN, A. T., LIP, G. Y., DE CATERINA, R., HEIDBUCHEL, H., ZAMORANO, J. L., AGNELLI, G., VERHEUGT, F. and CAMM, A. J. **State of play and future direction with NOACs: An expert consensus.** *Vascul. Pharmacol.*, 106 (2018) 9–21.

[50]. WANG, Y. and BAJOREK, B. **New oral anticoagulants in practice: Pharmacological and practical considerations.** *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, 14 (2014) 175–189.

[51]. HEIDBUCHEL, H. and VRIJENS, B. **Non-Vitamin K antagonist oral anticoagulants (NOAC): Considerations on once- vs. twice-daily regimens and their potential impact on medication adherence.** *Europace*, 17 (2015) 1317–1318.

- [52]. DOUKETIS, J. D. **Pharmacologic properties of the new oral anticoagulants: a clinician-oriented review with a focus on perioperative management.** *Curr. Pharm. Des.*, 16 (2010) 3436–41.
- [53]. BERTOLETTI, L., OLLIER, E., DUVILLARD, C., DELAVENNE, X., BEYENS, M. N., DE MAGALHAES, E., BELLET, F., BASSET, T., MISMETTI, P. and LAPORTE, S. **Direct oral anticoagulants: Current indications and unmet needs in the treatment of venous thromboembolism.** *Pharmacol. Res.*, 118 (2017) 33–42.
- [54]. PERZBORN, E., ROEHRIG, S., STRAUB, A., KUBITZA, D., MUECK, W. and LAUX, V. **DVT :A New Era in Anticoagulant Therapy Rivaroxaban: A New Oral Factor Xa Inhibitor.** *Arterioscler. Thromb.*, (2010) 376–381 doi:10.1161/ATVBAHA.110.202978.
- [55]. BLECH, S., EBNER, T., LUDWIG-SCHWELLINGER, E., STANGIER, J. and ROTH, W. **The Metabolism and Disposition of the Oral Direct Thrombin Inhibitor, Dabigatran, in Humans.** *Drug Metab. Dispos.*, 36 (2008) 386–399.
- [56]. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **CHMP Assessment Report for Pradaxa.** [Accessed: 1<sup>st</sup> october 2018]. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_\\_Public\\_assessment\\_report/human/000829/WC500041062.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Public_assessment_report/human/000829/WC500041062.pdf)
- [57]. IEKO, M., NAITOH, S., YOSHIDA, M. and TAKAHASHI, N. **Profiles of direct oral anticoagulants and clinical usage-dosage and dose regimen differences.** *J. Intensive Care*, 4 (2016) 1–6.
- [58]. W., M., S., S. and J., S. **Rivaroxaban and other novel oral anticoagulants: Pharmacokinetics in healthy subjects, specific patient populations and relevance of coagulation monitoring.** *Thromb. J.*, 11 (2013).
- [59]. MUECK, W., ERIKSSON, B. I., BAUER, K. A., BORRIS, L., DAHL, O. E., FISHER, W. D., GENT, M., HAAS, S., HUISMAN, M. V., KAKKAR, A. K., KÄLEBO, P., KWONG, L. M., MISSELWITZ, F. and TURPIE, A. G. **Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban - An oral, direct factor Xa inhibitor - In patients undergoing major orthopaedic surgery.** *Clin. Pharmacokinet.*, 47 (2008) 203–216.
- [60]. KUBITZA, D., BECKA, M., ZUEHLSDORF, M. and MUECK, W. **Body weight has limited influence on the safety, tolerability, pharmacokinetics, or pharmacodynamics of rivaroxaban (BAY 59-7939) in healthy subjects.** *J. Clin. Pharmacol.*, 47 (2007) 218–226.

- [61]. KREUTZ, R., HAAS, S., HOLBERG, G., LASSEN, M. R., MANTOVANI, L. G., SCHMIDT, A. and TURPIE, A. G. G. **Rivaroxaban compared with standard thromboprophylaxis after major orthopaedic surgery: Co-medication interactions.** *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 81 (2016) 724–734.
- [62]. EUROPEAN MEDECINES AGENCY. **Summary of Product Characteristics of XARELTO®.** [Accessed in 06 october 2016]. Available in [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_Product\\_Information/human/000944/WC500057108.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Product_Information/human/000944/WC500057108.pdf)
- [63]. JACKSON, L. R. and BECKER, R. C. **Novel oral anticoagulants: Pharmacology, coagulation measures, and considerations for reversal.** *J. Thromb. Thrombolysis*, 37 (2014) 380–391.
- [64]. POPOVA, L.V., KONDRATIEVA, T.B., AKSENOVA, M. B., KHLEVCHUK, T.V. and KANEVSKAYA, M. Z. **Recommendations on the Use of Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulants in Patients with Atrial Fibrillation (Based on 2018 European Heart Rhythm Association Practical Guide).** *Kardiologija*, 59 (2019) 68–79.
- [65]. WIESEN, M. H. J., BLAICH, C., MÜLLER, C., STREICHERT, T., PFISTER, R. and MICHELS, G. **The Direct Factor Xa Inhibitor Rivaroxaban Passes Into Human Breast Milk.** *Chest*, 150 (2016) e1–e4.
- [66]. WANG, L., HE, K., MAXWELL, B., GROSSMAN, S. J., TREMAINE, L. M., HUMPHREYS, W. G. and ZHANG, D. **Tissue distribution and elimination of [<sup>14</sup>C]apixaban in rats.** *Drug Metab. Dispos.*, 39 (2011) 256–264.
- [67]. ZHANG, D., HE, K., HERBST, J. J., KOLB, J., SHOU, W., WANG, L., BALIMANE, P.V., HAN, Y. H., GAN, J., FROST, C. E. and HUMPHREYS, W. G. **Characterization of efflux transporters involved in distribution and disposition of apixaban.** *Drug Metab. Dispos.*, 41 (2013) 827–835.
- [68]. HRADEC, J. **Apixaban.** *Interv. a Akutni Kardiol.*, 13 (2014) 196–201.
- [69]. NOUMAN, E. G., AL-GHOBASHY, M.A. and LOTFY, H. M. **Development and validation of LC-MSMS assay for the determination of the prodrug dabigatran etexilate and its active metabolites in human plasma.** *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 989 (2015) 37–45

- [70]. EUROPEAN MEDECINES AGENCY. **Assessment Report for Eliquis®**. [Accessed in 1<sup>st</sup> october 2018]. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_Public\\_assessment\\_report/human/002148/WC500107726.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Public_assessment_report/human/002148/WC500107726.pdf)
- [71]. PARASRAMPURIA, D.A. and TRUITT, K. E. **Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Edoxaban, a Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulant that Inhibits Clotting Factor Xa**. Clin. Pharmacokinet., 55 (2016) 641–655.
- [72]. MINOR, C., TELLOR, K. B. and ARMBRUSTER, A. L. **Edoxaban, a Novel Oral Factor Xa Inhibitor**. Ann. Pharmacother., 49 (2015) 843–850.
- [73]. EUROPEAN MEDECINES AGENCY. **EPPAR summary of Lixiana®**. [Accessed in 1<sup>st</sup> october 2018]. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/002629/WC500189048.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/002629/WC500189048.pdf)
- [74]. MENDELL, J., TACHIBANA, M., SHI, M. and KUNITADA, S. **Effects of food on the pharmacokinetics of edoxaban, an oral direct factor Xa inhibitor, in healthy volunteers**. J. Clin. Pharmacol., 51 (2011) 687–694.
- [75]. MATSUSHIMA, N., LEE, F., SATO, T., WEISS, D. and MENDELL, J. **Bioavailability and safety of the factor xa inhibitor edoxaban and the effects of quinidine in healthy subjects**. Clin. Pharmacol. Drug Dev., 2 (2013) 358–366.
- [76]. MENDELL, J., JOHNSON, L. and CHEN, S. **An open-label, phase I study to evaluate the effects of hepatic impairment on edoxaban pharmacokinetics and pharmacodynamics**. J. Clin. Pharmacol., 55 (2015) 1395–1405.
- [77]. MENDELL, J., ZAHIR, H., MATSUSHIMA, N., NOVECK, R., LEE, F., CHEN, S., ZHANG, G. and SHI, M. **Drug-drug interaction studies of cardiovascular drugs involving p-glycoprotein, an efflux transporter, on the pharmacokinetics of edoxaban, an oral factor xa inhibitor**. Am. J. Cardiovasc. Drugs, 13 (2013) 331–342.
- [78]. N.C., C., J., H., J.S., G. and J.W., E. **Betrixaban (PRT054021): Pharmacology, dose selection and clinical studies**. Future Cardiol., 10 (2014) 43–52.
- [79]. M., P., G., M. and L., T. **Evaluation of the oral direct factor Xa inhibitor-betrixaban**. Expert Opin. Investig. Drugs, 22 (2013) 1465–1472.

- [80]. GARLAND, S. G., DEREMER, C. E., SMITH, S. M. and GUMS, J. G. **Betrixaban: A New Oral Factor Xa Inhibitor for Extended Venous Thromboembolism Prophylaxis in High-Risk Hospitalized Patients.** *Ann. Pharmacother.*, 52 (2018) 554–561.
- [81]. DALE, B. J., CHAN, N. C. and EIKELBOOM, J. W. **Laboratory measurement of the direct oral anticoagulants.** *Br. J. Haematol.*, 172 (2016) 315–336.
- [82]. PEDERSEN-BJERGAARD, S., GJELSTAD, A. and HALVORSEN, T. G. **Sample Preparation.** *Bioanal. Pharm. Sample Prep. Chromatogr. Mass Spectrom.*, 1184 (2015) 73–122.
- [83]. ROHDE, G. **Determination of rivaroxaban - a novel, oral, direct Factor Xa inhibitor - in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 872 (2008) 43–50.
- [84]. SCHMITZ, E. M. H., BOONEN, K., VAN DEN HEUVEL, D. J. A., VAN DONGEN, J. L. J., SCHELLINGS, M. W. M., EMMEN, J. M. A., VAN DER GRAAF, F., BRUNSVELD, L. and VAN DE KERKHOFF, D. **Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants.** *J. Thromb. Haemost.*, 12 (2014) 1636–1646.
- [85]. KUHN, J., GRIPP, T., FLIEDER, T., DITTRICH, M., HENDIG, D., BUSSE, J., KNABBE, C. and BIRSCHMANN, I. **UPLC-MRM mass spectrometry method for measurement of the coagulation inhibitors dabigatran and rivaroxaban in human plasma and its comparison with functional assays.** *PLoS One*, 10 (2015) 1–19.
- [86]. DE VILLIERS, A., LESTREMAU, F., SZUCS, R., GÉLÉBART, S., DAVID, F. and SANDRA, P. **Evaluation of ultra performance liquid chromatography. Part I. Possibilities and limitations.** *J. Chromatogr. A*, 1127 (2006) 60–69.
- [87]. HANADA, K., MATSUMOTO, S. I., SHIBATA, S., MATSUBARA, H., TSUKIMURA, Y. and TAKAHASHI, H. **A quantitative LC/MSMS method for determination of edoxaban, a Xa inhibitor and its pharmacokinetic application in patients after total knee arthroplasty.** *Biomed. Chromatogr.*, 32 (2018).
- [88]. LINDAHL, S., DYRKORN, R., SPIGSET, O. and HEGSTAD, S. **Quantification of apixaban, dabigatran, edoxaban, and rivaroxaban in human serum by UHPLC-MS/MS - Method development, validation, and application.** *Ther. Drug Monit.*, 40 (2018) 369–376.

- [89]. ZHENG, S., LUO, S. BIN, MEI, Y. BIN, GUO, J., TONG, L. J., ZHANG, Q. and YE, X. Y. **Simultaneous Determination of Rivaroxaban and Enalapril in Rat Plasma by UPLC–MS/MS and Its Application to A Pharmacokinetic Interaction Study.** Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 44 (2019) 229–236.
- [90]. DELAVENNE, X., MISMETTI, P. and BASSET, T. **Rapid determination of apixaban concentration in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Application to pharmacokinetic study.** J. Pharm. Biomed. Anal., 78–79 (2013) 150–153.
- [91]. AYRTON, J., DEAR, G. J., LEAVENS, W. J., MALLET, D. N. and PLUMB, R. S. **The use of turbulent flow chromatography\_MS for compound in plasma.** Rapid Commun. Mass Spectrom., 11 (1997) 1953–1958.
- [92]. GUILLARME, D., NGUYEN, D. T. T., RUDAZ, S. and VEUTHEY, J. L. **Recent developments in liquid chromatography-Impact on qualitative and quantitative performance.** J. Chromatogr. A, 1149 (2007) 20–29.
- [93]. Braithwaite A. and Smith F. J. - **Chromatographic methods.** 5<sup>th</sup> Edition. United Kingdom, 1996. ISBN 0-75-140158-7.
- [94]. CUKER, A. **Laboratory measurement of the non-vitamin K antagonist oral anticoagulants: selecting the optimal assay based on drug, assay availability, and clinical indication.** J. Thromb. Thrombolysis, 41 (2016) 241–247.
- [95]. VOGESER, M. **Liquid chromatography-tandem mass spectrometry - Application in the clinical laboratory.** Clin. Chem. Lab. Med., 41 (2003) 117–126.
- [96]. SCHWERTNER, H. A. and STANKUS, J. J. **Characterization of the Fluorescent Spectra and Intensity of Dabigatran and Dabigatran Etxilate: Application to HPLC Analysis with Fluorescent Detection.** J. Chromatogr. Sci., 54 (2016) 1648–1651"

**Annex I.** Physicochemical characteristics of direct oral anticoagulants (DOACs) [14-19].

<b>DOAC</b>	<b>Molecular mass (g mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>LogS (Aqueous solubility)</b>	<b>Lipophilicity (LogP)</b>	<b>pKa</b>	<b>PSA (Å)</b>
Apixaban	459.49	-3.83 (67.80 mg L <sup>-1</sup> )	2.23	pKa <sup>a</sup> =13.12	110.77
Betrixaban	451.91	-4.44 (16.29 mg L <sup>-1</sup> )	3.86	pKa <sup>a</sup> =11.63 pKa <sup>b</sup> =1.19	107.41
Dabigatran	471.52	-3.68 (97.47 mg L <sup>-1</sup> )	2.37	pKa <sup>a</sup> =11.51 pKa <sup>b</sup> =4.24	150.22
Dabigatran etexilate	627.73	-5.13 (4.66 mg L <sup>-1</sup> )	5.17	pKa <sup>a</sup> =17.89 pKa <sup>b</sup> =3.87	154.05
Edoxaban	548.06	-4.68 (11.40 mg L <sup>-1</sup> )	1.61	pKa <sup>a</sup> =11.08 pKa <sup>b</sup> =7.23	136.62
Rivaroxaban	435.88	-4.64 (10.04 mg L <sup>-1</sup> )	1.74	pKa <sup>a</sup> =13.6	88.18

<sup>a</sup> acid function; <sup>b</sup> basic function

LogS, intrinsic solubility in the neutral state; LogP, octanol/water partition coefficient; pKa, dissociation constant; PSA, polar surface area

**Annex 2.** Main pharmacokinetic parameters of four direct oral anticoagulants (DOACs) reported in human phase III clinical trials [21].

<b>DOAC</b>	<b>Oral bioavailability (%)</b>	<b>t<sub>max</sub> (h)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>	<b>VD (L)</b>	<b>PPB (%)</b>	<b>Elimination routes</b>	<b>Major metabolites</b>
<b>Apixaban</b>	66	1-3	8-15	21	87	25% renal route 75% hepatobiliary route	O-demethyl apixaban sulphate (non-active)
<b>Betrixaban</b>	34	3-4	37 (PD t <sub>1/2</sub> = 20)	32	60	<8% renal route 85% hepatobiliary route	NF
<b>Dabigatran</b>	6 (prodrug)	2-3	12-14	60-70	35	80% renal 20% bile	Conjugated dabigatran active metabolites
<b>Edoxaban</b>	62	1-2	10-14	107	55	1/3 renal excretion of parent drug 2/3 biliary and intestinal routes	M4 (active)
<b>Rivaroxaban</b>	80	2-4	Young people: 5-9 Elderly people: 11-13	50	> 90	1/3 renal excretion of parent drug 2/3 metabolized and then eliminated by renal (50%) and hepatobiliary routes (50%)	NF

NF, not found; PD, Pharmacodynamic; PPB, plasma protein binding; t<sub>max</sub>, time required to reach the maximum concentration in plasma; t<sub>1/2</sub>, half-life time; VD, apparent volume of distribution.



**Annex 3.** Sample pre-treatment and recovery (%) of direct oral anticoagulants (DOACs) and some of their metabolites from biological samples.

<b>Analyte</b>	<b>Matrix</b>	<b>Sample Volume (µL)</b>	<b>Sample Preparation</b>	<b>Solvents and Extraction Process</b>	<b>Recovery (%)</b>	<b>Ref.</b>
Rivaroxaban	Human plasma	200	PP	0.5 mL of methanol containing the IS	≈ 100	[83]
Apixaban	Human plasma	100	PP	800 µL of IS in methanol	NR	[89]
Apixaban; Dabigatran; Edoxaban; Rivaroxaban	Human plasma	100	PP	200 mL of IS solution prepared in acetonitrile	96 - 101	[44]
Rivaroxaban	Human plasma	200	PP	400 µL of acetonitrile	77.3	[35]
Dabigatran; Rivaroxaban	Human plasma	100	PP	600 µL of methanol : HCl 0.1 N (90 : 10, v/v) containing the IS at a concentration of 50 g/L	82.9 - 105.6 90.2 - 104.6	[37]

Apixaban; O-desmethyl apixaban sulfate	Human plasma	100	SPE (50 mg, C <sub>18</sub> cartridges)	<p>1. Conditioning: 1 mL of methanol followed by 1 mL of 5 mM ammonium acetate;</p> <p>2. Washing: 1 mL of methanol : 5 mM ammonium acetate (10:90, v/v);</p> <p>3. Elution: 1 mL of methanol (in two steps of 0.5 mL).</p>	81.1 - 82.1 46.6 - 48.8	[39]
Rivaroxaban	Human plasma	NR	SPE (Phenomenex Strata-X 33- $\mu$ m polymeric reversed phase, 30 mg/ 3 mL)	<p>1. Conditioning step: 3 mL of methanol, 3 mL of water and 3 mL of borate buffer (pH 9.0, 0.2 M);</p> <p>2. Washing: 3 mL of borate buffer (pH 9.0, 0.2 M), followed by 3 mL of methanol : water (50 : 50, v/v);</p> <p>3. Elution: 1 mL of a methanol : glacial acetic acid (99 : 1, v/v) solution.</p>	93.3 - 97.7	[33]
Apixaban; Dabigatran; Rivaroxaban	Human plasma	50	PP	100 $\mu$ L of acetonitrile containing the IS	$\approx$ 100	[42]
Dabigatran; Rivaroxaban	Human plasma	100	PP	900 $\mu$ L of IS solution prepared in methanol/water (90:10) containing 10 mM of HCl	87 104.5	[84]
Dabigatran; Dabigatran etexilate	Human plasma	1000	PP	1.5 mL of acetonitrile	89.5 - 97.0 92.2 - 101.5	[69]
Dabigatran	Human plasma	50	PP	200 $\mu$ L of acetonitrile	98.0 - 104.9	[37]

Apixaban; Dabigatran; Rivaroxaban.	Human plasma	200	SPE (C <sub>18</sub> Bond Elute Cartridge, 1 ml, 100 mg)	<p>1. Activation: methanol and water; 2. Washing: water; 3. Elution: 500 µL of methanol; 4. Dilution: 100 µL of 0.1% formic acid.</p>	102.2 82.2 98.4	[43]
Apixaban; Dabigatran; Edoxaban; Rivaroxaban.	Human plasma	50	Magnetic separation (tube rack with integrated magnets)	<p>1<sup>st</sup> Addition of 40 µL of magnetic beads suspension; 2<sup>nd</sup> PP with 150 µL of acetonitrile/reconstitution buffer containing the IS.</p>	84.2 - 103.2	[27]
Rivaroxaban.	Human plasma	200	PP	400 µL of methanol	95.2 - 101.0	[34]
Apixaban; Rivaroxaban; Dabigatran; Dabigatran Etexilate.	Human plasma	100	PP	300 µL of methanol	NR	[32]
Apixaban; Betrixaban; Dabigatran; Edoxaban; Edoxaban-M4; Rivaroxaban.	Human plasma	250	SPE (µElution PRIME HLB 96- well cartridges)	<p>1. Sample buffer: 150 µL of acetate buffer (pH=5.0; 0.2 M) and 25 µL of IS solution prepared in acetonitrile : water (1 : 1, v/v); 2. Washing: methanol : water (5 : 95, v/v; 200 µL); 3. Elution: methanol (100 µL).</p>	85.5 - 93.1 109.7 - 120.1 80.6 - 84.8 98.9 - 100.9 83.9 - 86.8 101.6 - 104.2	[39]
Edoxaban	Human plasma	100	PP	200 or 400 µL of Acetonitrile	≈ 100	[87]
Rivaroxaban; Apixaban; Edoxaban.	Rat plasma	100	PP	200 µL of the IS working solution (100 ng/mL in acetonitrile)	81.9 - 90.8	[41]

Dabigatran; Dabigatran etexilate.	Rat plasma	50	PP (96-well format)	100 µL of methanol solution containing 100 ng/mL of IS	87.7 - 98.7 81.5 - 89.5	[38]
Rivaroxaban	Rat plasma	100	PP	200 µL of acetonitrile containing 100 ng/mL of IS	81.7 - 89.4	[88]
Rivaroxaban	Human urine (pH 2.5)	200	MEPS (C <sub>8</sub> sorbent)	1. Sorbent activation: 100 µL of methanol and then 100 µL of water; 2. Loading of the urine sample containing the IS; 3. Elution: 100 µL of methanol.	99.3 - 101.9	[28]

HLB, hydrophilic-lipophilic balance; IS, internal standard; MEPS, microextraction by packed sorbent; NR, not reported; PP, protein precipitation; SPE, solid-phase extraction.

**Annex 4.** Liquid chromatography techniques for the quantitative determination of direct oral anticoagulants (DOACs) and some of their metabolites in different matrices.

Technique	Analytes	Matrix	Sample preparation	IS	Column	Mobile phase	Elution	Flow (mL min <sup>-1</sup> )	Detection	Run time (min)	LLOQ (ng mL <sup>-1</sup> )	Calibration range (ng mL <sup>-1</sup> )	Ref.
HPLC	Rivaroxaban	Human Plasma	PP	<sup>2</sup> H <sub>5</sub> , <sup>15</sup> N)-rivaroxaban	Purosphere RP18e (125 x 4 mm; 5 µm) column	Acetonitrile and 0.01 mol/L ammonium acetate buffer adjusted with formic acid to pH 3.0	Gradient	1	MS/MS	6	0.5	0.5-500	[83]
						Acetonitrile:water (55:45, v/v)	Isocratic	1.2	UV [249 nm]	4	5	5- 40000	[30]
HPLC	Rivaroxaban	Tablets	-	Caffeine	Phenomenex Luna C <sub>18</sub> 100Å LC column (250 x 4.6mm, 5 µm)	(A) distilled water with 0.1% formic acid	Gradient	0.5	MS/MS (positive ionization electrospray)	1.3	5	5-500	[89]
						(B) acetonitrile with 0.1% formic acid	Isocratic	0.8	MS/MS (positive ionization electrospray)	1.5	0.005	0.005- 1000	[28]
UHPLC	Rivaroxaban	Human Urine	MEPS	Carvedilol	Zorbax Rapid Resolution High Definition SB-C <sub>18</sub> column (50 mm x 2.1 mm, 1.8 m)	0.1% formic acid and acetonitrile (70:30, v/v)	Isocratic	0.8	MS/MS (positive ionization electrospray)	1.5	0.005	0.005- 1000	[28]

<b>Turbulent flow LC</b>	Apixaban;	Human Plasma	PP	(13C6)-apixaban; (13C6)-rivaroxaban	Accucore PhenylHexyl analytical column (100 x 2.1 mm, 2.7 mm).	ammonium acetate; (B) 0.1% formic acid in methanol:acetonitrile (1+1) (C) acetonitrile:acetone	Gradient	2.0	MS (positive ionization electrospray)	6	I	1-500	[44]
	Dabigatran; Edoxaban; Rivaroxaban												
<b>UHPLC</b>	Rivaroxaban	Human Plasma	PP	Risperidone	Acquity BEH <sup>TM</sup> C <sub>18</sub> column (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)	acetonitrile: 10 mM ammonium acetate (80:20, v/v)	Isocratic	0.3	MS/MS (positive ionization electrospray)	1.5	0.57	0.57-625	[35]
	Dabigatran; Rivaroxaban	Human Plasma	PP	(13C6)-Dabigatran ; (13C6)-Rivaroxaban;	Acquity UPLC BEH C <sub>18</sub> column (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)	(A) distilled water containing 0.1% formic acid and 0.07 g of ammonium acetate (B) acetonitrile with 0.1% formic acid	Gradient	0.3	MS/MS (positive ionization electrospray)	NR	2.5	2.5-500	[36]
<b>HPLC</b>	Dabigatran; Dabigatran etexilate	Rat Plasma	PP	Paclitaxel	Ultimate TM XB-C <sub>18</sub> (4.6 x 50mm, 5 μm)	(A) pure water (B) methanol containing 0.01% formic acid	Gradient	0.3	MS/MS (positive ion mode)	7	I	1-500	[38]

<b>HPLC</b>	Apixaban; O-desmethyl apixaban sulfate	Human Plasma	SPE	<sup>13</sup> CD <sub>3</sub> - BMS- 562247; <sup>13</sup> CD <sub>6</sub> - BMS- 730823	Chromolith monolithic column ROD RP-18e (50 x 4.6 mm)	(A) 5 mM ammonium acetate with 0.05% formic acid (60:40, v/v) (B) acetonitrile:water: methanol with 2 mM ammonium acetate (85:10:5, v/v/v)	Isocratic	1	3	1: 5	1-1000; 5-1000	[40]	MS/MS (positive ionization electrospray)
	Dabigatran; Rivaroxaban ; Apixaban	Human Plasma	-	( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> )- Dabigatran ; ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> )- Rivaroxab an; <sup>13</sup> C, <sup>2</sup> H <sub>7</sub> - Apixaban	Acquity UPLC BEH C <sub>8</sub> column (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)	(A) 2.5 mM ammonium formate at pH 3.0 (B) acetonitrile	Gradient	0.3	4.57	0.025	23-750	[84]	MS/MS (positive ionization electrospray)
<b>HPLC</b>	Rivaroxaban	Human plasma	SPE	Prednisolo ne	Phenomenex Luna C <sub>18</sub> 100 Å LC Column (250 x 4.6 mm, 5-μm)	Acetonitrile:water (55:45, v/v)	Isocratic	1.0	< 6	10	10- 4000	[33]	UV [249 nm]
	Apixaban; Dabigatran; Rivaroxaban	Human Plasma	PP	( <sup>13</sup> C, <sup>2</sup> H)- apixaban; ( <sup>13</sup> C)- dabigatran; ( <sup>13</sup> C)- rivaroxaba n	Hypersil Gold C <sub>18</sub> column (50 x 2.1 mm, 1.9 μm)	(A) acetonitrile (B) ultrapure water containing 0.1% formic acid	Gradient	0.35	2.5	1	1-500	[42]	MS/MS (positive ionization electrospray)

<b>UPLC</b>	Dabigatran; Rivaroxaban	Human Plasma	PP	( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> )- Dabigatran ; ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> )- Rivaroxab an; RP column Waters, Acquity UPLC BEH Phenyl (50 x 2.1 mm, 1.7 µm)	water:methanol containing 0.1% formic acid and 2 mM ammonium acetate (B) 5%/95% water:methanol containing also 0.1% formic acid and 2 mM ammonium acetate	Gradient	0.35	MRM MS (positive ionization electrospray)	2.5	0.46; 0.54	0.8-800	[85]
	Dabigatran; Etexilate; Dabigatran	Human Plasma	PP	Sertraline hydrochlo ride Waters Xterra C <sub>8</sub> column (50 x 3 mm, 3 µm)	Water: acetonitrile (70:30, v/v) adjusted to pH 3.0 using 0.05% formic acid solution.	Isocratic	0.8 (2-5 min)	MS/MS (positive ionization electrospray)	5	1	1-600	[69]
<b>LC</b>	Dabigatran; Dabigatran acylgucuron ides	Human Plasma	PP	( <sup>13</sup> C) - dabigatran Poroshell 120 EC C <sub>18</sub> column (50 x 3.0 mm, 2.7 µm) column	(A) water containing 0.2% formic acid and 10 mM ammonium formate (B) acetonitrile	Gradient	0.6	MS/MS (positive ionization electrospray)	7	2.5	2.5-1000	[37]
	Dabigatran Erexilate	Tablets	-	Eclipse XDB C <sub>8</sub> (250 x 4.6 mm, 5 µm)	0.01 M orthophosphoric acid (pH 2.6);acetonitrile (60:40, v/v)	Isocratic	1.5	UV [225 nm]	NR	0.25	5-100	[31]
<b>UPLC</b>	Rivaroxaban ; Apixaban; Edoxaban	Rat Plasma	PP	Acquity BEH C <sub>18</sub> column (50 mm x 2.1 mm, 1.7 µm)	(A) acetonitrile (B) 0.1 % formic acid	Gradient	0.4	MS/MS (positive ionization electrospray)	3.5	1.0	1-200 1-100 1-500	[41]
	Apixaban; Dabigatran; Rivaroxaban	Human Plasma	SPE	( <sup>13</sup> C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> )- apixaban; ( <sup>2</sup> H <sub>6</sub> )- dabigatran RP C <sub>18</sub> column Zorbax Eclipse plus (100 x 2.1 mm, 3.5 µm)	(A) ammonium acetate 2 mM + 0.05% formic acid (B) 0.1% formic acid in methanol	Gradient	0.3	MS/MS (positive ionization electrospray)	10	1	1-500	[43]



<b>UPLC</b>	Apixaban; Betrixaban; Dabigatran; Edoxaban; Edoxaban M4; Rivaroxaban	Human Plasma	SPE	( <sup>13</sup> C, <sup>2</sup> H <sub>6</sub> )- apixaban; ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> )- betrixaban ; ( <sup>2</sup> H <sub>6</sub> )- edoxaban; ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> )- rivaroxaba n	Acquity BEH Phenyl (50 x 2.1 mm, 1.7 μm)	(A) 5 mM ammonium formate in water with 5 % acetonitrile (B) 100 % acetonitrile	Gradient	0.5	4	1.0	1-1000	MS/MS (positive ionization electrospray)	[39]
	<b>UHPLC</b>	Apixaban; Dabigatran; Edoxaban; Rivaroxaban	Human Plasma	Magnetic separation	( <sup>13</sup> C, <sup>2</sup> H <sub>7</sub> )- apixaban; ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> )- dabigatran; ( <sup>2</sup> H <sub>6</sub> )- edoxaban; ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> )- rivaroxaba n	Hypersil Gold C <sub>8</sub> column (50 x 2.1 mm, 1.9 μm)	(A) acetonitrile (B) 0.1% formic acid	Gradient	0.4	2	0.84 - 2.01	2-500	MS/MS (positive ionization electrospray)
<b>HPLC</b>	Rivaroxaban	Human Plasma	PP	Rivaroxab an-d4	Kinetex C <sub>18</sub> HPLC column (100 x 3 mm, 2.6 μm)	(A) ultrapure water containing 0.01% formic acid (B) methanol 0.01% formic acid (40:60, v/v)	Isocratic	0.5	5	2	2-500	MS/MS (positive ionization electrospray)	[34]
<b>UHPLC</b>	Dabigatran; Rivaroxaban ; Apixaban; Dabigatran Etexilate;	Human Plasma	PP	NR	Poroshell 120, EC- C <sub>18</sub> column (50 x 3.0 mm, 2.7 mm)	(A) water (B) methanol both containing 0.1% formic acid as an additive	Gradient	0.7	7	15; 15; 16; 19	20-200	UV- VIS [294 nm 249 nm 280 nm 340 nm]	[32]
<b>LC</b>	Edoxaban	Human Plasma	PP	Ticlopidin e	Capcell Pak C <sub>8</sub> DD (250 x 3.0 mm, 5 μm)	50 mM ammonium acetate containing 1% formic acid, acetonitrile and deionized water (10:45:45, v/v/v)	Isocratic	0.2	10	1	5-500	MS/MS (positive ionization electrospray)	[87]

<b>UPLC</b>	Rivaroxaban	Rat Plasma	PP	Diazepam	Acquity BEH C18 column (50 x 2.1 mm, 1.7 µm)	(A) acetonitrile, (B) 0.1% formic acid	Gradient	0.3	MS/MS (positive ionization electrospray)	4	1	1-200	[88]
-------------	-------------	------------	----	----------	--	--	----------	-----	--	---	---	-------	------

BEH, bridged ethyl hybrid; HPLC, high performance liquid chromatography; IS, Internal standard; LC, liquid chromatography; LLOQ, lower limit of quantification; MEPS, microextraction by packed sorbent; MS, mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; NR, not reported; PP, protein precipitation; RP, reverse phase; SPE, solid-phase extraction; UHPLC, Ultra-high performance liquid chromatography; UV, ultra violet;

## Annex 5. Article published in Analytica Chimica Acta.

Analytica Chimica Acta 1076 (2019) 18–31



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aca](http://www.elsevier.com/locate/aca)



### Review

## Liquid chromatographic methods for the determination of direct oral anticoagulant drugs in biological samples: A critical review



Filipa Gouveia<sup>a</sup>, Joana Bicker<sup>a, b</sup>, Joana Gonçalves<sup>a, b</sup>, Gilberto Alves<sup>c</sup>, Amílcar Falcão<sup>a, b, d, \*</sup>, Ana Fortuna<sup>a, b, d</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>b</sup> Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, 3004-517, Coimbra, Portugal

<sup>c</sup> CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

<sup>d</sup> CIBIT - Coimbra Institute for Biomedical Imaging and Translational Research, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

### HIGHLIGHTS

- New direct oral anticoagulants (DOACs) seem to require plasma concentrations monitoring.
- New and significant analytical methodologies are starting to be developed to quantify DOACs.
- The main HPLC and UHPLC methods for DOACs quantification are critically discussed.
- Strategies to extract DOACs from biological samples are herein compared.
- Optimization of chromatographic conditions in accordance to physico-chemical and pharmacological characteristics of DOACs.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 January 2019

Received in revised form

28 March 2019

Accepted 29 March 2019

Available online 8 April 2019

#### Keywords:

Liquid chromatography

### ABSTRACT

Direct oral anticoagulants (DOACs) are first-line drugs used for the treatment of venous thromboembolism and prevention of stroke in patients with atrial fibrillation. These drugs do not require the regular biochemical monitoring that is mandatory for warfarin, and they exhibit shorter half-lives and have a faster onset of action. Since recent real-world studies evidence a higher prevalence of adverse side effects than what was anticipated in clinical trials, monitoring the plasma concentrations of DOACs is being used to personalize their pharmacotherapy, in accordance to the characteristics of the patient, and to evaluate the adherence to therapy.

**Abbreviations:** ABC, ATP-binding cassette; AUC, area under the plasma concentration versus time curve; BCRP, Breast Cancer Resistance Protein;  $C_{max}$ , maximum plasma concentration; CrCl, creatinine clearance; CYP, Cytochrome-P450; DAD, diode-array detection; DMSO, dimethyl sulfoxide; DOAC, direct oral anticoagulant; EMA, European Medicines Agency; ESI, electrospray ionization; FDA, Food and Drug Administration; FXa, factor Xa; HPLC, High performance liquid chromatography; ICH, intracranial hemorrhage; IS, internal standard;  $K_i$ , inhibition constant; LLE, liquid-liquid extraction; LLME, liquid-liquid microextraction; LLOQ, lower limit of quantification; MEPS, microextraction by packed sorbent; MIP, molecularly imprinted polymers; MRM, multiple reaction monitoring; o.d, once daily; MS, mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; PDE5i, type 5-phosphodiesterase inhibitor; P-gp, P-glycoprotein; PP, protein precipitation; PSA, polar surface area; SPAF, stroke prevention in atrial fibrillation; SPE, solid-phase extraction; SPME, solid-phase microextraction; BEH, bridged ethyl hybrid; t.d, twice-daily;  $T_{max}$ , time to reach  $C_{max}$  in plasma;  $t_{1/2}$ , elimination half-life; UHPLC, ultra-high performance liquid chromatography; UV, ultraviolet; VTE, venous thromboembolism.

\* Corresponding author. Laboratory of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Pólo das Ciências da Saúde, Azinhaga de Santa Comba 3000-548 Coimbra, Portugal.

E-mail address: [acfalcao@ff.uc.pt](mailto:acfalcao@ff.uc.pt) (A. Falcão).

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.03.061>

0003-2670/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.