



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

Leonardo Oliveira de Sousa Assunção

Desenvolvimento e validação de um método HPLC-MS/MS para a determinação de olmesartana em plasma humano

GOIÂNIA/GO

2026



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(s) autor(es): Leonardo Oliveira de Sousa Assunção

Título do trabalho: Desenvolvimento e validação de um método HPLC-MS/MS para a determinação de olmesartana em plasma humano.

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)s autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Carlos Da Cunha, Diretor**, em 12/06/2026, às 07:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Oliveira De Sousa Assunção**, **Discente**, em 24/06/2026, às 13:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6222652** e o código CRC **3F4B7D15**.

Referência: Processo nº 23070.026305/2026-61

SEI nº 6222652

LEONARDO OLIVEIRA DE SOUSA ASSUNÇÃO

Desenvolvimento e validação de um método HPLC-MS/MS para a determinação de olmesartana em plasma humano

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

GOIÂNIA/GO

2026

Assunção, Leonardo Oliveira de Sousa

Desenvolvimento e validação de um método HPLC-MS/MS para a determinação de olmesartana em plasma humano [manuscrito] / Leonardo Oliveira de Sousa Assunção. - 2026.

XXXII, 32 f.: 2026

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Farmácia, Goiânia, 2026.

Anexo.

Bibliografia.

1. Olmesartana. 2. Validação Analítica. 3. Precipitação de Proteínas. 4. Clae-em.

I. Cunha, Luiz Carlos da, orient. II. Título.

CDU 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos dez dias do mês de junho do ano de 2026 iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “Desenvolvimento e validação de um método HPLC-MS/MS para a determinação de olmesartana em plasma humano”, de autoria de Leonardo Oliveira de Sousa Assunção, do curso de Farmácia, da Faculdade de Farmácia da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo Professor **Dr. Luiz Carlos da Cunha** da Faculdade de Farmácia com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Dr. Alessandro de Carvalho Cruz** da Universidade Estácio de Sá e **Dr. Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto** da Universidade Federal de Goiás. Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de **9,0**, tendo sido o TCC considerado APROVADO.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Carlos Da Cunha, Professor do Magistério Superior**, em 10/06/2026, às 14:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jerônimo Raimundo De Oliveira Neto, Técnico de Laboratório**, em 10/06/2026, às 15:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandro De Carvalho Cruz, Usuário Externo**, em 11/06/2026, às 08:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6222547** e o código CRC **A05AD148**.

Resumo

Introdução: A olmesartana medoxomila é um pró-fármaco que, após a absorção, é convertido em sua forma ativa, a olmesartana, pertencente ao grupo dos bloqueadores dos receptores da angiotensina II. As técnicas de extração e quantificação utilizadas para a olmesartana envolvem preparos complexos da amostra geralmente utilizando Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas. Assim, justifica-se o desenvolvimento de alternativas robustas e rápidas, como a precipitação de proteínas plasmáticas, utilizando técnicas instrumentais mais simples, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas, para aplicação na quantificação de fármacos. **Objetivos:** Desenvolver e validar uma técnica analítica sensível, específica e de fácil aplicação, baseada na precipitação de proteínas para o preparo de amostras, destinada à determinação de olmesartana em plasma humano. **Métodos:** Foi utilizado um sistema CLAE-EM (Agilent – Sciex) com coluna Luna C18 100 x 4,6 mm e fase móvel constituída por acetonitrila e solução de acetato de amônio 2 mM com ácido fórmico 0,125% na proporção 70:30 (v/v), utilizada em fluxo de 900 µL/min. **Resultados e Discussão:** O tempo de corrida foi de 2,3 minutos, com coeficiente de correlação linear de 0,996347. A precisão e a exatidão intracorrída avaliadas no limite inferior de quantificação foram de 12,38% e 5,00% respectivamente. Todos os parâmetros de validação atenderam aos critérios estabelecidos pela RDC nº 27/2012, quanto à linearidade, precisão, exatidão, seletividade, efeito matriz e estabilidade testados. **Conclusão:** A técnica desenvolvida para a quantificação de olmesartana em plasma humano por LC-MS/MS demonstrou ser simples, rápida, sensível, reprodutível e adequada para aplicação em estudos de bioequivalência farmacêutica.

Palavras-chave: Olmesartana. Validação analítica. Precipitação de proteínas. CLAE-EM.

Abstract

Introduction: Olmesartan medoxomil is a prodrug that, after absorption, is converted into its active form, olmesartan, belonging to the group of angiotensin II receptor blockers. The extraction and quantification techniques used for olmesartan involve complex sample preparations, generally employing Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry. Thus, the development of robust and rapid alternatives is justified, such as plasma protein precipitation using simpler instrumental techniques, such as High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry, for application in drug quantification.

Objectives: To develop and validate a sensitive, specific and easy-to-apply analytical technique, based on protein precipitation for sample preparation, intended for the determination of olmesartan in human plasma.

Methods: An HPLC-MS system (Agilent – Sciex) was used with a Luna C18 100 × 4.6 mm column and a mobile phase consisting of acetonitrile and 2 mM ammonium acetate solution with 0.125% formic acid in a 70:30 (v/v) ratio, at a flow rate of 900 µL/min.

Results and Discussion: The run time was 2.3 minutes, with a linear correlation coefficient of 0.996347. The intra-run precision and accuracy evaluated at the lower limit of quantification were 12.38% and 5.00%, respectively. All validation parameters met the criteria established by RDC No. 27/2012, regarding linearity, precision, accuracy, selectivity, matrix effect and stability.

Conclusion: The technique developed for the quantification of olmesartan in human plasma by LC-MS/MS proved to be simple, fast, sensitive, reproducible and suitable for application in pharmaceutical bioequivalence studies.

Keywords: Olmesartan. Analytical validation. Protein precipitation. HPLC-MS.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer àqueles que estiveram comigo desde sempre: meus pais, Silvio de Sousa e Cristina Maria de Oliveira, e minha avó, Enilde Maria de Queiroz. Também agradeço a quem chegou depois: meus irmãos, Vinícius Oliveira e Sofia Oliveira. Vocês são toda a minha base na vida.

Não teria realizado este trabalho sem os aprendizados adquiridos no setor de Bioequivalência Farmacêutica do Instituto de Ciências Farmacêuticas. Agradeço a todos os funcionários que ali trabalham. Agradeço pelos conselhos e ensinamentos e destaco aqui a figura do meu coorientador, Iram Moreira Mundim.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha, por ter aceitado participar deste trabalho que encerra, enfim, meu ciclo de graduação na Universidade Federal de Goiás.

Aos amigos, que, para minha sorte, são muitos e os melhores, agradeço por cada momento. Tentar incluir todos aqui certamente seria injusto, pois eu acabaria esquecendo alguém. Entretanto, há nomes que não poderiam deixar de ser reconhecidos. À Beatriz Vieira, que sempre esteve disposta a ajudar em qualquer assunto, pessoal ou relacionado ao curso. Uma excelente profissional farmacêutica foi formada ali. Ao Matheus Felipe, pela amizade que, com toda certeza, levarei para sempre. E ao meu antigo colega de quarto, Lucas Aurélio, que, entre outras coisas, me fez enxergar as pessoas e a ciência de forma mais entusiasmada. Vocês são ótimos. Sem mencionar mais nomes, gostaria de agradecer a todos que fizeram parte disto de alguma forma.

Sumário

1 Introdução e Revisão da literatura	6
1.1 Justificativa	11
1.2 Objetivos	11
1.3 Específicos:.....	12
2 Materiais e Métodos.....	12
2.1 Reagentes, substâncias e padrões	12
2.2 Instrumentos e equipamentos.....	13
2.3 Condições cromatográficas	14
2.4 Preparo de soluções estoque, curva de calibração e controle de qualidade	14
2.5 Descrição da extração.....	14
2.6 Linearidade, Precisão e Exatidão.....	15
2.7 Validação do método	16
2.7.1 Seletividade	16
2.7.2 Efeito matriz.....	17
2.7.3 Efeito residual.....	17
2.7.4 Estabilidades em matriz biológica	18
2.7.5 Estabilidade do analito e PI em solução (ESP SL).....	19
2.7.6 Aplicação da técnica validada	19
3 Resultados e discussão	21
3.1 Desenvolvimento da técnica (parâmetros do sistema LC-MS/MS).....	21
3.2 Testes da validação e resultados gerais dos testes	22
3.2.1 Seletividade	22
3.2.2 Efeito matriz.....	23
3.2.3 Linearidade e sensibilidade.....	24
3.2.4 Estabilidades.....	26
3.3 Dados farmacocinéticos	27
4 Conclusão.....	29
5 Referências	30

1 Introdução e Revisão da literatura

A pressão arterial (PA) é a força exercida pelo sangue circulante contra as paredes das artérias. O registro é feito por meio de dois valores. O primeiro, pressão sistólica, indica a pressão nos vasos sanguíneos quando o coração bate ou se contrai, já o segundo, pressão diastólica, indica a pressão nos vasos quando o coração repousa entre os batimentos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021). A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é definida como uma condição multifatorial, crônica e não transmissível, caracterizada por elevação persistente da pressão arterial (sistólica maior ou igual a 140 mmHg e/ou diastólica maior ou igual a 90 mmHg), medida com a técnica adequada em pelo menos duas ocasiões diferente, quando não ocorre o uso de medicação anti-hipertensiva (BRANDÃO et al., 2025).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2021) a HAS é um problema que leva à um aumento significativo do risco de doenças no coração, encéfalo, rins e outros órgãos. No Brasil e no mundo, as doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade e a HA é o principal fator de risco responsável por elas. Estima-se que aproximadamente 1,4 bilhão de pessoas apresentem HAS, porém apenas cerca de 14% possuem a condição devidamente controlada. Esse cenário persiste apesar da disponibilidade de tratamentos eficazes e com boa relação custo-benefício.

Como abordagem terapêutica, a estratégia de tratamento da hipertensão arterial sistêmica engloba ações de curto e longo prazo para o controle da pressão arterial e redução do risco cardiovascular. O foco do tratamento engloba três esferas: autocuidado e ações educativas, terapias não medicamentosas e terapias medicamentosas. O tratamento não medicamentoso contempla, por exemplo, ações de autocuidado, alimentação adequada e saudável, controle do peso corporal, prática regular de atividade física, redução ou cessação do tabagismo e da ingestão de bebidas alcoólicas, controle do estresse e maior qualidade do sono (BRANDÃO et al., 2025).

A maioria dos pacientes com HAS precisarão associar o tratamento não medicamentoso ao tratamento medicamentoso. O tratamento medicamentoso, em associação ou monoterapia é a estratégia terapêutica preferencial para a maioria dos casos de HAS apesar do grau da doença e do Risco Cardiovascular (RC) associado. Neste contexto, preconiza-se que o tratamento medicamentoso seja baseado em cinco classes terapêuticas principais: inibidores da enzima

conversora de angiotensina (IECA), bloqueadores do sistema renina angiotensina II (BRA), bloqueadores de canais de cálcio (BCC), diuréticos e betabloqueadores (BB). A escolha de qual será utilizada deve ser avaliada de forma individualizada considerando particularidades de cada paciente, levando em consideração a presença de comorbidades, raça/etnia, indicações e contraindicações conhecidas, acesso, acessibilidade e preferências do paciente (BRANDÃO et al.,2025; OMS, 2021).

Diante deste cenário, novos medicamentos mais acessíveis são necessários para redução de custos e adesão ao tratamento, que é benéfico tanto individualmente quanto no contexto do Sistema Único de Saúde (SUS), configurando como importante estratégia para saúde pública (QUENTAL et al., 2008). Medicamentos genéricos e similares podem ser alternativas viáveis em diversos cenários, e para isto, estudos de bioequivalência precisam ser cada vez mais rápidos e confiáveis.

Como mencionado anteriormente, o tratamento farmacológico é uma importante estratégia terapêutica e nesse contexto têm-se a olmesartana medoxomila. A olmesartana medoxomila é um pró-fármaco que, após a absorção no trato gastrointestinal, sofre completa hidrólise, sendo convertida em sua forma biologicamente ativa, a olmesartana. Este fármaco pertence ao grupo dos bloqueadores dos receptores da angiotensina II (BRA), que atuam ligando-se seletivamente ao receptor de angiotensina tipo 1 (AT1). Dessa forma, impedem que a angiotensina II exerça seus efeitos hipertensivos, os quais incluem vasoconstrição, estímulo à síntese e liberação de aldosterona e ADH, ativação cardíaca e reabsorção renal de sódio, entre outros. Em consequência, os efeitos fisiológicos da olmesartana traduzem-se em redução da pressão arterial, menores níveis de aldosterona, diminuição da atividade cardíaca e aumento da excreção de sódio (SCOTT; McCORMACK, 2008). No tratamento da hipertensão arterial, a olmesartana é frequentemente utilizada em associação com outros fármacos, como bloqueadores de canais de cálcio ou diuréticos (BRANDÃO et al.,2025). Além disso, a olmesartana também é utilizada em casos de nefropatia associada ao diabetes tipo 2, particularmente em pacientes que não toleram inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (SCOTT; McCORMACK, 2008).

A etapa analítica em estudos de bioequivalência utilizando plasma como matriz biológica é sempre desafiador e possui particularidades durante o desenvolvimento da técnica. De forma geral, o plasma humano é uma matriz complexa, contendo proteínas, lipídeos, sais minerais, hormônios e outras substâncias que podem interferir de diferentes maneiras na

detecção e quantificação do fármaco de interesse. Diante disto, uma técnica capaz de entregar linearidade, precisão, exatidão, rapidez, robustez e confiabilidade é essencial para gerar dados farmacocinéticos coerentes (SOARES, 2025).

Diante da matriz usada, as técnicas estão frequentemente sujeitas ao efeito de matriz devido à presença de seus componentes que eluem de forma conjunta com o analito de interesse e podem provocar a supressão ou intensificação do sinal analítico e consequentemente um desempenho insatisfatório do método, principalmente quando o Padrão Interno (PI) não acompanha estas variações (FU; LI; PICARD, 2024).

O PI consiste em um análogo estruturalmente semelhante ao analito ou em um composto marcado com isótopo estável, adicionado às amostras em concentração constante e conhecida, com a finalidade de facilitar a quantificação do analito alvo. O uso de PI é recomendado em aplicações de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM, ou do inglês Liquid Chromatography Mass Spectrometry - LC-MS) para a quantificação de fármacos em bioanálises. Devido à complexidade das amostras biológicas, do preparo das amostras e dos instrumentos analíticos, é esperado certo grau de variabilidade no sinal analítico, tanto intracorrida quanto intercorrida. (ZHANG et al., 2024).

A principal técnica analítica empregada na quantificação de compostos em matrizes biológicas é a LC-MS, por sua robustez, versatilidade e elevada sensibilidade e seletividade, o que permite a obtenção de resultados altamente confiáveis. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da RDC nº 27/2012, recomenda a utilização de métodos cromatográficos na condução de estudos de bioequivalência e biodisponibilidade. No entanto, outras metodologias podem ser adotadas, desde que devidamente justificadas (ANVISA, 2012; ALANAZI, 2025).

A CLAE revolucionou a análise química ao substituir a cromatografia líquida clássica, que dependia exclusivamente da gravidade para movimentar a fase móvel pela coluna, resultando em separações lentas e pouco eficientes. A introdução de bombas de alta pressão e partículas de fase estacionária de menor diâmetro conferiu ao método maior velocidade, resolução e sensibilidade, tornando-o uma das técnicas analíticas mais utilizadas em laboratórios farmacêuticos e de pesquisa. Na técnica de CLAE a amostra é impulsionada por um líquido (fase móvel) em alta pressão através de uma coluna empacotada com partículas para promover a separação de compostos de interesse. O sistema CLAE é composto por reservatório

de fase móvel, sendo a vazão e mistura gerenciado por software e impulsionado por uma ou mais bombas. Sistema de degaseificação para evitar a formação de bolhas. Em seguida um injetor de amostras que introduz a amostra no fluxo da fase móvel com o destino à coluna. A coluna contém material interno, geralmente sílica ou octadecilsilano (C18) necessário para realizar a separação e fica armazenada em um forno com a temperatura regulável. Geralmente o sistema está acoplado a um detector, como exemplo do espectrofotométrico ou espectrômetro de massas (NETO; NUNES, 2003).

A espectrometria de massas é uma técnica que se baseia na ionização da amostra, gerando íons que são então introduzidos no analisador. No analisador, esses íons são separados de acordo com suas diferentes trajetórias em campos elétricos e/ou magnéticos, em função de suas razões massa/carga (m/z). Após a separação, os íons colidem com um detector, que converte o sinal em dados processados por um sistema computacional, onde as razões m/z são relacionadas à sua abundância relativa e apresentadas no formato de um espectro de massas. Para análises quantitativas em matrizes biológicas complexas, utiliza-se frequentemente o espectrômetro do tipo triplo quadrupolo, composto por três quadrupolos alinhados em série (Q1, Q2 e Q3). O primeiro quadrupolo (Q1) atua como filtro seletivo, permitindo a passagem apenas do íon com a razão m/z correspondente ao analito de interesse, denominado de íon precursor. Em seguida, esse íon é direcionado ao quadrupolo central (Q2), que funciona como célula de colisão: o íon precursor colide com um gás inerte, geralmente nitrogênio, e é fragmentado, originando os íons produto. O terceiro quadrupolo (Q3) seleciona então um ou mais desses íons produto por sua razão m/z característica. O monitoramento simultâneo de múltiplas transições íon precursor e íon produto constitui o modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), que confere ao método elevada seletividade e especificidade, sendo considerado o padrão ouro para a quantificação de fármacos em matrizes biológicas (ALANAZI, 2025).

Diversas técnicas já foram descritas para a quantificação de olmesartana pelo método de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, tanto isoladamente quanto em associação com outros fármacos. No entanto, muitos deles apresentam limitações por serem demorados, caros ou exigirem grandes volumes de amostra. Alguns utilizam protocolos extensos de extração em fase sólida (VAIDYA et al., 2008; KUMAR et al., 2014; MANDOUR et al., 2020) o que dificulta a análise na rotina laboratorial. A extração em fase sólida é um método comum para isolar e separar analitos de amostras líquidas. Nesse processo, a amostra

passa por um cartucho contendo um material de fase sólida, previamente condicionado e ativado com um solvente orgânico, permitindo a adsorção dos analitos. Em seguida, realiza-se a etapa de lavagem para remover interferências, enquanto os analitos permanecem retidos no adsorvente. Por fim, a eluição é feita com solventes orgânicos adequados, possibilitando a obtenção dos analitos de forma mais pura e concentrada. Esse método é amplamente utilizado por oferecer boa seletividade e melhorar a qualidade das análises (MANDAL, 2023)

Outra técnica, baseada na diferença de solubilidade do analito entre a amostra aquosa e um solvente orgânico, chamada de extração líquida-líquida, utilizada nos estudos de Kumar et al. (2019); Mandour et al. (2020); Liu et al. (2010); Das et al. (2015) se mostra uma alternativa mais barata em relação à fase sólida. No entanto, apresenta desvantagens importantes relacionadas à maior complexidade operacional e ao aumento do tempo de preparo das amostras, devido ao uso de solventes orgânicos tóxicos e altamente voláteis (por exemplo, metil terc-butil éter, diclorometano, clorobutano e acetato de etila), o que demanda maior cuidado no manuseio, descarte adequado de resíduos químicos e infraestrutura laboratorial específica. Além disso, requer um número adicional de etapas envolvidas, como a evaporação e secagem dos reagentes com ar comprimido ou gás nitrogênio. A técnica também pode envolver maior consumo de reagentes e utilização de mais equipamentos durante o preparo e análise das amostras (PITT, 2009).

Considerando estas questões, uma nova técnica de extração de Precipitação de Proteína (PP) foi desenvolvida, sendo caracterizada por uma técnica simples, rápida e barata que funciona pela adição de um solvente orgânico, como acetonitrila ou metanol, que causa a desnaturação e agregação das proteínas, fazendo com que elas se tornem insolúveis e precipitem. Após essa etapa, a amostra é centrifugada para separar o material sólido (proteínas) do sobrenadante, que contém os analitos de interesse. Outros trabalhos já haviam explorado técnicas semelhantes utilizando espectrômetro de massas acoplado a um UPLC. O trabalho de De Nicolò e colaboradores (2016) desenvolveu uma metodologia de extração com precipitação de proteínas, o que foi um grande avanço em relação aos trabalhos com olmesartana da época. Porém, como relatado no artigo, o tempo de retenção da olmesartana ficou em 4.35 minutos e um dos processos da extração consiste em secar a amostra após o processo de precipitação do plasma, aumentando a complexidade do processo de extração. No artigo de Jeong, et al. (2021) utilizou-se precipitação de proteínas de forma mais prática, mas com uma linearidade de 5 – 2500 ng/mL, que para estudos de bioequivalência farmacêutica com um elevado número de

coletas, prejudicaria a quantificação na fase de eliminação do fármaco, principalmente para uma dosagem de 20 mg de olmesartana, como a utilizada no estudo. Uma técnica mais recentemente desenvolvida para a quantificação de olmesartana foi descrito por West et al. (2024) no qual a metodologia demonstrou praticidade na extração da amostra. Entretanto, o tempo de corrida estendido para aproximadamente 4 minutos representa uma limitação, pois exige maior tempo para analisar um maior número de amostras como no caso de estudos de bioequivalência. Além disso, o estudo utilizou uma técnica de eluição em gradiente, que, embora eficiente, apresenta desvantagens em termos de simplicidade instrumental. Quando se emprega mais de uma linha para transmissão do fluxo de fase móvel, aumenta-se o número de parâmetros a serem controlados, elevando a probabilidade de variações na proporção da fase móvel, aumento no número de soluções preparadas e, conseqüentemente, impactando a reprodutibilidade e a precisão da técnica (PITT, 2009; Jeong et al., 2021).

As técnicas de precipitação de proteínas desenvolvidas até o momento têm utilizado sistemas de UPLC acoplados a espectrômetros de massas para a análise das amostras. Em contraste, a técnica aqui relatada faz uso de um HPLC, tecnologia mais acessível e com uma metodologia mais prática em comparação com as técnicas previamente descritas.

Nesse contexto, o presente trabalho propõe desenvolver e validar uma técnica LC-MS/MS sensível, específica e de fácil aplicação, baseado na precipitação de proteínas para a preparação de amostras, destinado à determinação de olmesartana em plasma humano, em conformidade com as diretrizes da RDC N° 27, de 17 de maio de 2012, que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.

1.1 Justificativa

O trabalho em questão foi escolhido em consequência de estar alinhado à atuação profissional do autor em um centro de bioequivalência farmacêutica, permitindo a aplicação prática dos conhecimentos e contribuindo para a integração entre teoria e prática, além de ter sido a primeira técnica integralmente desenvolvida e validada pelo autor.

1.2 Objetivos

Desenvolver e validar uma técnica analítica (CL-EM) sensível, específica e de fácil aplicação, baseada na precipitação de proteínas para a preparação de amostras, destinada à

determinação de olmesartana em plasma humano, em conformidade com a RDC nº 27, de 17 de maio de 2012.

1.3 Específicos:

- a) desenvolver técnica de extração e preparo de amostra biológica para ser utilizado em uma análise por LC-MS/MS;
- b) desenvolver método de detecção e quantificação de olmesartana através da técnica de LC-MS/MS;
- c) validar a técnica desenvolvida de acordo com a RDC N°27 de 2012;
- d) verificar a aplicabilidade da técnica na quantificação de olmesartana em amostras reais de plasma humano.

2 Materiais e Métodos

2.1 Reagentes, substâncias e padrões

Os padrões do ativo e padrão interno (PI), olmesartana e candesartana respectivamente, foram produzidos por Toronto Research Chemicals (TRC). Os reagentes e substâncias utilizados no estudo incluíram:

- a) Acetato de Amônio – P.A;
- b) Ácido fórmico – 88%;
- c) Acetonitrila - Grau HPLC;
- d) Isopropanol – 99.5%;
- e) Metanol – Grau HPLC;
- f) Plasma branco contendo EDTA K3.

Os fármacos concomitantes são para a RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 medicamentos eventuais e comedicação utilizados por voluntários durante estudos de bioequivalência/biodisponibilidade, que podem interferir na análise, exigindo sua presença na validação para garantir que a técnica distinga o fármaco em estudo dos demais interferentes. Os padrões utilizados como fármacos concomitantes foram:

- a) Levanlodipino;
- b) (R)-anlodipino;

- c) Cafeína;
- d) Paracetamol;
- e) Butilbrometo de escopolamina;
- f) Dipirona;
- g) Cotinina;
- h) Cloridrato de ondansetrona.

2.2 Instrumentos e equipamentos

A quantificação do fármaco foi realizada em HPLC com os seguintes componentes: bomba, desgaseificador, autoinjeter com cooler e forno de coluna ambos do modelo Agilent 1200 Series, acoplado à um espectrômetro de massas Sciex API 5000 MS/MS. O espectrômetro de massas foi operado em modo de ionização por eletronspray positivo (ESI+). Os íons monitorados (Monitoramento Múltiplo de Reação – MRM) foram: olmesartana (precursor – 447.2, produto – 190.1) e candesartana (precursor – 441.2, produto – 263.2).

As análises por espectrometria de massas foram realizadas a partir da otimização dos parâmetros de transição iônica e das condições da fonte de ionização, visando maior sensibilidade e seletividade na detecção dos analitos. Para cada composto, foram ajustados os potenciais do espectrômetro, incluindo potencial de desagrupamento, potencial de entrada, energia de colisão e potencial de saída da célula de colisão, de modo a maximizar a eficiência de fragmentação e a intensidade do sinal dos íons selecionados. Adicionalmente, os parâmetros da fonte de ionização foram otimizados para garantir estabilidade e eficiência na formação dos íons, incluindo os fluxos dos gases de nebulização, auxiliar e de cortina, bem como a dissociação ativada por colisão, a voltagem da fonte de íons e a temperatura da fonte. Essas condições foram empregadas ao longo das análises para promover adequada ionização e fragmentação das moléculas.

O desenvolvimento do estudo ocorreu integralmente no Instituto de Ciências Farmacêuticas. A etapa analítica, que incluiu o desenvolvimento, a validação do método e a análise das amostras dos participantes da pesquisa, foi realizada no laboratório de bioequivalência farmacêutica. Já a etapa clínica, envolvendo a administração do medicamento, a coleta de sangue e a separação do plasma, ocorreu na unidade clínica da mesma instituição. Todos os funcionários da empresa e terceirizados atuantes contribuíram de diferentes formas para a realização deste estudo.

2.3 Condições cromatográficas

A fase móvel foi constituída por acetonitrila e solução de acetato de amônio 2 mM com ácido fórmico 0,125% na proporção 70:30 (v/v), utilizada em fluxo de 900 $\mu\text{L}/\text{min}$. As amostras foram injetadas em um autoinjeter mantido a 15 °C, com volume de injeção de amostra de 8 μL . A coluna empregada foi uma Luna 5 μm C18, 100 $\times$ 4,6 mm, com temperatura do forno controlada a 25 ± 2 °C. O tempo de corrida foi fixado em 2,3 minutos. A solução de lavagem da agulha foi uma mistura de acetonitrila 50%:isopropanol (1:1 v:v)

2.4 Preparo de soluções estoque, curva de calibração e controle de qualidade

As soluções estoque de olmesartana e candesartana foram preparadas em metanol:água (1:1) (v:v), com concentração final de 500 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, após dissolução inicial em metanol puro. Para a construção da curva de calibração da olmesartana, foram preparadas soluções nas concentrações de 10; 30; 250; 1000; 2500; 5000; 8000; e 10000 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$, utilizando a solução estoque ou uma solução intermediária com concentração de 5000 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$, também em metanol:água (1:1) (v:v).

As soluções de controle de qualidade (QC) de baixa, média e alta concentração foram preparadas em metanol:água (1:1) (v:v) com concentrações de 30; 5000; e 8000 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$ respectivamente. As amostras de controle de qualidade preparadas em plasma utilizadas durante a validação para os ensaios de estabilidade, precisão e exatidão nas concentrações de 2; 6; 1000; 1600; e 3200 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$ foram preparadas a partir da solução estoque ou de solução intermediária na concentração de 1000 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$ diretamente em plasma branco. A solução de trabalho de candesartana, com concentração de 5000 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$, também foi preparada em metanol:água (1:1) (v:v) a partir da respectiva solução estoque.

2.5 Descrição da extração

A técnica de extração usada foi a precipitação de proteínas, onde é adicionado um agente precipitante que arrasta fragmentos maiores para o fundo da mistura enquanto o analito de interesse fica disponível na parte orgânica. Após agitar e centrifugar o sobrenadante é transferido para utilização.

A técnica de PP segue da seguinte forma: em eppendorf com capacidade de 2 mL adicionou-se 125 μL de plasma branco, 25 μL de padrão interno (candesartana), 25 μL de ativo (olmesartana) e 1000 μL de acetonitrila 100%, agitou-se por 1 minuto e centrifugou-se por 5

minutos à 10000 rpm. Transferiu-se 100 uL para vial contendo 300 uL de fase móvel e posteriormente as amostras foram submetidas à análise no sistema LC-MS/MS.

2.6 Linearidade, Precisão e Exatidão

No presente trabalho a curva de calibração era composta por 16 amostras sendo elas dispostas em 8 níveis distintos de concentração mais duas amostras branco extraídas e duas amostras branco contaminada com padrão interno. As amostras branco consistem em amostra de plasma sem adição de ativo ou padrão interno extraída em conjunto com o ensaio para avaliação de possíveis contaminações e/ou interferências. As amostras de branco contaminada com padrão interno são amostras de plasma contaminadas com a solução de padrão interno e extraída em conjunto com o ensaio.

As concentrações nominais dos pontos da curva de calibração, dos controles de qualidade e da faixa de linearidade estão apresentadas no Quadro 01. Ressalta-se que essas concentrações são correspondentes às concentrações finais no plasma, portanto cinco vezes menores que as das soluções estoque preparadas em metanol 50%. Isso ocorre porque, durante a técnica de extração, são adicionados 25 µL da solução padrão a 125 µL de plasma branco, resultando em uma diluição de 1:5.

A linearidade foi demonstrada através da avaliação do coeficiente de correlação linear mínimo de 0,99. Cada curva de calibração precisa cumprir um mínimo de aprovação de 75% dos seus níveis, sendo tolerado desvio de até 20% em relação ao valor nominal para o LIQ e até 15% em relação ao valor nominal para os demais níveis.

Quadro 01 – Concentrações em plasma da Curva de Calibração e Controles de Qualidade

	Identificação	Concentração (ng/mL)
Curva de calibração	LIQ	2
	Ponto 2	6
	Ponto 3	50
	Ponto 4	200
	Ponto 5	500
	Ponto 6	1000
	Ponto 7	1600
	LSQ	2000
Controles de qualidade	CQ LIQ	2
	CQB	6
	CQM	1000
	CQA	1600
	CQD	3200

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Legenda: LIQ – Limite Inferior de Quantificação; LSQ – Limite Superior de Quantificação; CQ LIQ – Controle de Qualidade no Limite Inferior de Quantificação CQB – Controle de Qualidade de baixa Concentração; CQM – Controle de Qualidade de Média Concentração; CQA – Controle de Qualidade de Alta Concentração; CQD – Controle de Qualidade de Diluição

Os testes foram avaliados três vezes em três dias distintos de forma intracorrída (mesma corrida) e intercorrída (três corridas independentes), utilizando os controles LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. Os parâmetros foram calculados por meio do Coeficiente de Variação Percentual (CV%) e do Erro Padrão Relativo (EPR) para precisão e exatidão respectivamente, não sendo aceitos valores superiores a 20% para LIQ e 15% para as demais concentrações.

Com base nos resultados obtidos e apresentados no Quadro 02, foram comparadas as somatórias absolutas dos desvios dos padrões de calibração utilizando ponderações linear, inversa e inversa do quadrado (x , $1/x$ e $1/x^2$), com o objetivo de identificar a ponderação que resultasse no menor erro relativo entre os valores nominais e os valores obtidos pela equação da curva. A ponderação $1/x^2$ apresentou o melhor ajuste, e a linearidade foi, portanto, calculada com base nessa regressão.

Quadro 02 – Desvios nominais das concentrações da curva de calibração considerando diferentes ponderações

Corrida	Lote 1			Lote 2			Lote 3		
Ponderação	x	1/X	1/X ²	x	1/X	1/X ²	x	1/X	1/X ²
Somatório	242.57	95.82	75.61	ERRO	66.44	66.00	ERRO	61.99	56.61

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026

Legenda: ERRO - Não foi possível a quantificação de todos os valores da curva de calibração; x – linear; 1/X – inversa; 1/X² - inversa do quadrado.

2.7 Validação do método

Os ensaios realizados na validação foram os de seletividade; efeito residual; efeito matriz; precisão; exatidão; estabilidade em matriz biológica (estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento; estabilidade de curta duração; estabilidade de longa duração; estabilidade pós processamento); e estabilidade do analito e padrão interno (PI) em solução de acordo com RDC N° 27, de 17 de maio de 2012.

2.7.1 Seletividade

Foram analisadas amostras de plasma provenientes de seis fontes distintas contendo ácido etilenodiaminotetracético tripotássico (EDTA K3), sendo quatro amostras normais, uma

lipêmica e uma hemolisada (grau de hemólise 3%). Para a realização do teste, cada matriz foi avaliada nas seguintes condições: sem fármacos concomitantes; com fármacos concomitantes; contaminada com ativo na concentração do LSQ; e contaminada com PI. A interferência foi verificada de modo a garantir que não houvesse picos interferentes nos tempos de retenção do ativo e do padrão interno em cada matriz, comparando as respostas obtidas com a amostras extraída na concentração de LIQ (matriz em branco contaminada na concentração de 2 ng.mL⁻¹) e do padrão interno extraído. Os fármacos concomitantes em suas respectivas concentrações são: cafeína (1000 ng.mL⁻¹), levandolipino (7.5 ng.mL⁻¹), R-anlodipino (7.5 ng.mL⁻¹) dipirona (8000 ng.mL⁻¹), ondansetrona (1500 ng.mL⁻¹), paracetamol (20000 ng.mL⁻¹), butilbrometo de escopolamina (2 ng.mL⁻¹) e cotinina (1500 ng.mL⁻¹).

2.7.2 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado utilizando amostras de plasma processadas, posteriormente adicionadas do analito e PI, em concentrações equivalentes às das amostras de controle de qualidade CQB e CQA. Foram utilizadas quatro amostras de plasma normal, duas amostras de plasma hemolisado (3%) e duas amostras de plasma lipêmico sem fármacos concomitantes, assim como quatro amostras de plasma normal, duas amostras de plasma hemolisado (3%) e duas amostras de plasma lipêmico com fármacos concomitantes. Estas amostras foram comparadas com três amostras, preparadas sem plasma utilizando metanol 50% como solvente, na concentração de CQB e três amostras na concentração de CQA. Para cada amostra, calculou-se o fator de matriz normalizado pelo padrão interno (FMN) segundo a fórmula:

$$FMN = \frac{\frac{\text{Resposta do analito em matriz}}{\text{Resposta do PI em matriz}}}{\frac{\text{Resposta do analito em solução}}{\text{Resposta do PI em solução}}}$$

O Coeficiente de Variação dos FMN relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15%, conforme exigido para garantir a confiabilidade e consistência da técnica.

2.7.3 Efeito residual

O teste de efeito residual foi realizado para avaliar a eficiência da técnica em impedir que resíduos de uma amostra anterior interferissem na análise da amostra seguinte. Para isso, foram extraídas três amostras: uma amostra branca, uma amostra contendo concentração de

LIQ + PI e uma amostra contendo concentração de LSQ + PI. A corrida analítica consiste em injetar as amostras no seguinte modelo de sequência:

- a) Vial 1: amostra branco;
- b) Vial 2: amostra LIQ + PI;
- c) Vial 3: amostra LSQ + PI;
- d) Vial 1: amostra branco;
- e) Vial 1: amostra branco.

Caso não ocorra o aparecimento de picos interferentes acima de 20% do valor de área obtido para o ativo no LIQ e 5% do valor de área obtido para o padrão interno também na amostra LIQ nas duas amostras branco analisadas após a amostra de LSQ + PI (Vial 3) o teste é considerado aprovado.

2.7.4 Estabilidades em matriz biológica

Os resultados de exatidão obtidos na primeira de três corridas analíticas de exatidão e precisão serviram de base para aprovar o preparo das amostras utilizadas nos testes de Estabilidade em Ciclos de Congelamento e Descongelação (ECCD), Estabilidade de Curta Duração (ECD), Estabilidade de Longa Duração (ELD) e Estabilidade Pós-Processamento (EPP). Para esses estudos, foram utilizadas amostras de plasma branco enriquecidas com o fármaco ativo, acondicionadas em microtubos de 2 mL e mantidas sob congelamento a -20 °C até a realização das análises.

No ensaio de estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras passaram por seis ciclos consecutivos, cada um com pelo menos 12 horas de congelamento antes do descongelamento. O descongelamento é feito mantendo as amostras na bancada por pelo menos 30 minutos antes de serem novamente congeladas. Em seguida, avaliou-se a estabilidade da olmesartana em amostras de plasma, empregando seis réplicas dos controles de qualidade alto (CQA) e baixo (CQB), analisadas por meio de uma curva de calibração recém-preparada. Como critério para avaliação da estabilidade, a média do conjunto de amostras de controle de qualidade não pode apresentar variações acima de 15% em relação a seus valores nominais.

A estabilidade de curta duração foi analisada após seis réplicas de CQA e CQB serem retiradas do freezer à -20 °C e permanecerem em repouso, à temperatura ambiente sobre a bancada, por um período contínuo de 16 horas e 5 minutos. Após esse tempo, as amostras foram

processadas e extraídas utilizando uma curva de calibração recém preparada. Como critério para avaliação da estabilidade, a média do conjunto de amostras de controle de qualidade não pode apresentar variações acima de 15% em relação a seus valores nominais.

Já a estabilidade de longa duração foi investigada mantendo-se as amostras em freezer à -20 °C por um período de 111 dias. Após esse intervalo, seis réplicas de CQA e CQB foram extraídas e analisadas com uma curva de calibração recém-preparada, permitindo avaliar o comportamento do fármaco após armazenamento prolongado. Como critério para avaliação da estabilidade, a média do conjunto de amostras de controle de qualidade não pode apresentar variações acima de 15% em relação a seus valores nominais.

A estabilidade pós-processamento foi realizada após injeção e aprovação nos critérios da primeira corrida de precisão e exatidão. As amostras foram inicialmente armazenadas em refrigerador por 40,91 horas e, em seguida, permaneceram no autoinjeter por mais 30,21 horas. Depois desse período, a estabilidade foi verificada novamente por meio da repetição da análise das amostras com curva de calibração recém extraída. Como critério para avaliação da estabilidade, a média do conjunto de amostras de controle de qualidade não pode apresentar variações acima de 15% em relação a seus valores nominais.

2.7.5 Estabilidade do analito e PI em solução (ESP SL)

Para verificar a estabilidade das soluções do ativo e do padrão interno nas concentrações utilizadas, é necessário avaliá-las por um período superior ao tempo de uso ou armazenamento. Inicialmente, após a pesagem do ativo e PI, preparam-se soluções primárias e de trabalho, que são armazenadas sob refrigeração, em geladeira, entre 2 e 8 °C. Para o ensaio de estabilidade, retiram-se alíquotas dessas soluções de armazenamento e de uso, que são então comparadas a novas soluções preparadas a partir de uma pesagem recente do ativo e do padrão interno. A conclusão sobre a estabilidade é obtida por meio da comparação entre as médias das respostas instrumentais (razão de áreas) das soluções armazenadas, contaminadas com padrão interno recém-preparado, em relação às soluções recém-preparadas do ativo, também contaminadas com padrão interno de uso e de armazenamento.

2.7.6 Aplicação da técnica validada

A técnica validada foi utilizada para quantificar olmesartana em plasma de voluntários humanos sadios de acordo com a RDC N° 27 de 2012. Foi aplicado em um estudo

monocêntrico, aberto, cruzado, randomizado, prospectivo, com dois tratamentos (A e B), 2 sequências (AB e BA) 1 subgrupo, 2 períodos e dose única. O ensaio foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisas do Instituto de Ciências Farmacêuticas sob o número de protocolo 6.933.026. Participaram do estudo 44 participantes de pesquisa saudáveis (22 indivíduos do sexo masculino e 22 do sexo feminino) com idade de 18 à 55 anos que foram submetidos a duas formulações de olmesartana de 40 mg na forma de comprimido revestido.

Os tempos de coletas de sangue foram: Pré-dose ou 00,00; 00:15; 00:30; 00:45; 01:00; 01:15; 01:30; 01:45; 02:00; 02:20; 02:40; 03:00; 03:30; 04:00; 04:30; 05:00; 05:30; 06:00; 06:30; 07:00; 08:00; 09:00; 10:00; 12:00; 24:00; 36:00; 48:00; e 72:00 horas após a administração do medicamento.

Após obtenção das concentrações plasmáticas foram calculados os seguintes parâmetros farmacocinéticos utilizando o software Phoenix WinNonlin:

- a) $C_{\max}$ (concentração plasmática máxima observada): obtida a partir das concentrações máximas observada nos participantes de pesquisa
- b) AUC_{0-72h} (área sob a curva de concentração plasmática de zero até 72 horas): calculada pelo método dos trapezóides, conforme equação:

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

- C_i : concentração plasmática no tempo t_i .
 - C_{i+1} : concentração plasmática no tempo t_{i+1} .
 - t_i : tempo da coleta i .
 - t_{i+1} : tempo da coleta posterior à i .
 - n : número total de pontos de coleta utilizados no cálculo.
 - Σ : somatório das áreas calculadas entre cada par de pontos consecutivos.
- c) $T_{\max}$ (tempo necessário para atingir $C_{\max}$): o tempo onde o $C_{\max}$ é observado
 - d) $T_{1/2}$ (meia-vida de eliminação): Tempo para que a concentração plasmática de um fármaco seja reduzida à metade. Calculada pela equação:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K_e}$$

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

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

e) K_e (constante de eliminação): fração da droga removida do corpo por unidade de tempo calculada pela equação:

$$K_e = \frac{0,693}{t_{1/2}}$$

3 Resultados e discussão

3.1 Desenvolvimento da técnica (parâmetros do sistema LC-MS/MS)

A fórmula molecular da olmesartana ($C_{24}H_{26}N_6O_3$) apresenta diferenças estruturais relevantes em relação à molécula utilizada como padrão interno, a candesartana ($C_{33}H_{34}N_6O_6$). Essas distinções físicas e químicas refletem-se diretamente nos parâmetros de transição utilizados para a análise em LC-MS/MS, que estão detalhados na tabela 01. Tais parâmetros incluem a seleção dos íons precursores (Q1) e produtos (Q3), bem como os potenciais aplicados para promover a fragmentação e transmissão iônica no espectrômetro de massas

Tabela 01- Parâmetros de transição iônica (Q1/Q3) e potenciais otimizados do espectrômetro de massas para olmesartana e candesartana

Parâmetro	Olmesartana	Candesartana
Massa Q1 (m/z)	447.242	441.220
Massa Q3 (m/z)	190.100	263.200
Potencial de desagrupamento (V)	81	21
Potencial de entrada (V)	10	10
Energia de colisão (V)	75	21
Potencial de saída da célula de colisão (V)	20	12

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026

Legenda: m/z – Relação massa/carga; V – Volt

Além das transições específicas para cada analito, foram também otimizadas as condições da fonte de ionização, fundamentais para a eficiência e estabilidade na formação dos íons. Os parâmetros da fonte de ionização estão presentes na tabela 02. Os parâmetros em questão foram otimizados para melhorar a fragmentação das moléculas nas transições utilizadas conforme demonstrado na figura 01.

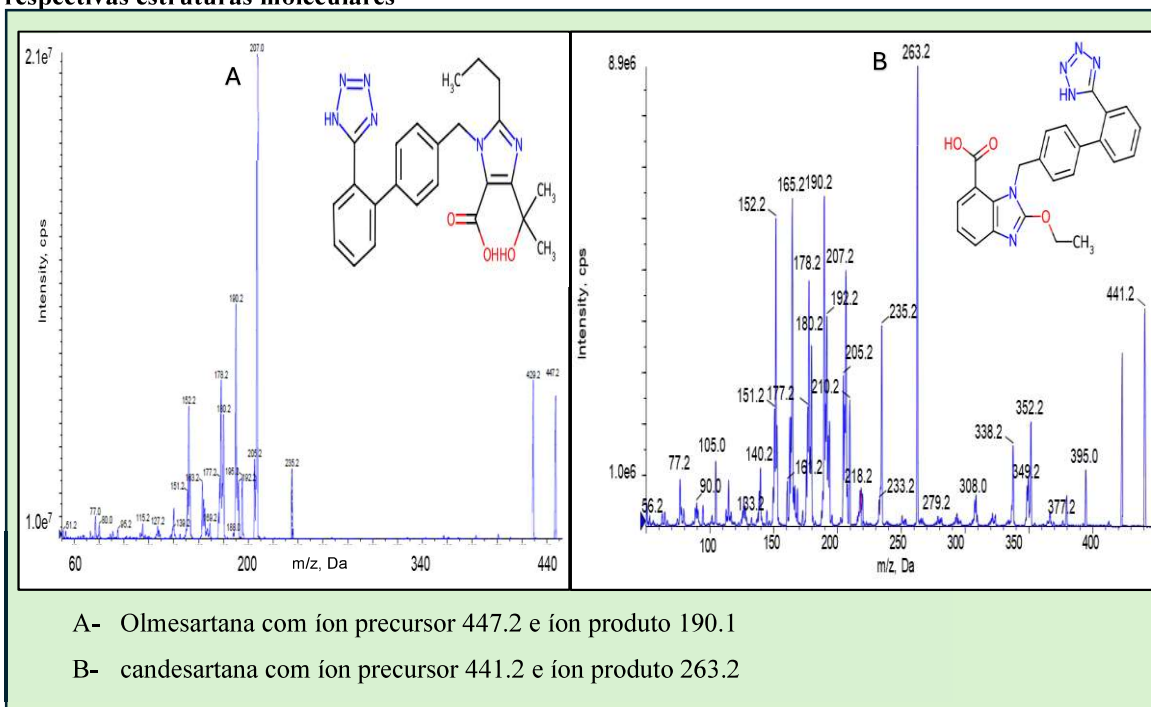
Tabela 02- Parâmetros operacionais da fonte de ionização e condições do espectrômetro de massas utilizados nas análises no decorrer do estudo

Parâmetro	Valor
Gás de nebulização	55
Gás auxiliar	45
Gás de cortina	35
Dissociação ativada por colisão	4
Voltagem da fonte de íons	5500 V
Temperatura da fonte	650 °C

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026

Legenda: °C – graus Celsius; V- Volt

Figura 01 - Espectros de massas de olmesartana e candesartana com seus íons precursores/produto e suas respectivas estruturas moleculares



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026

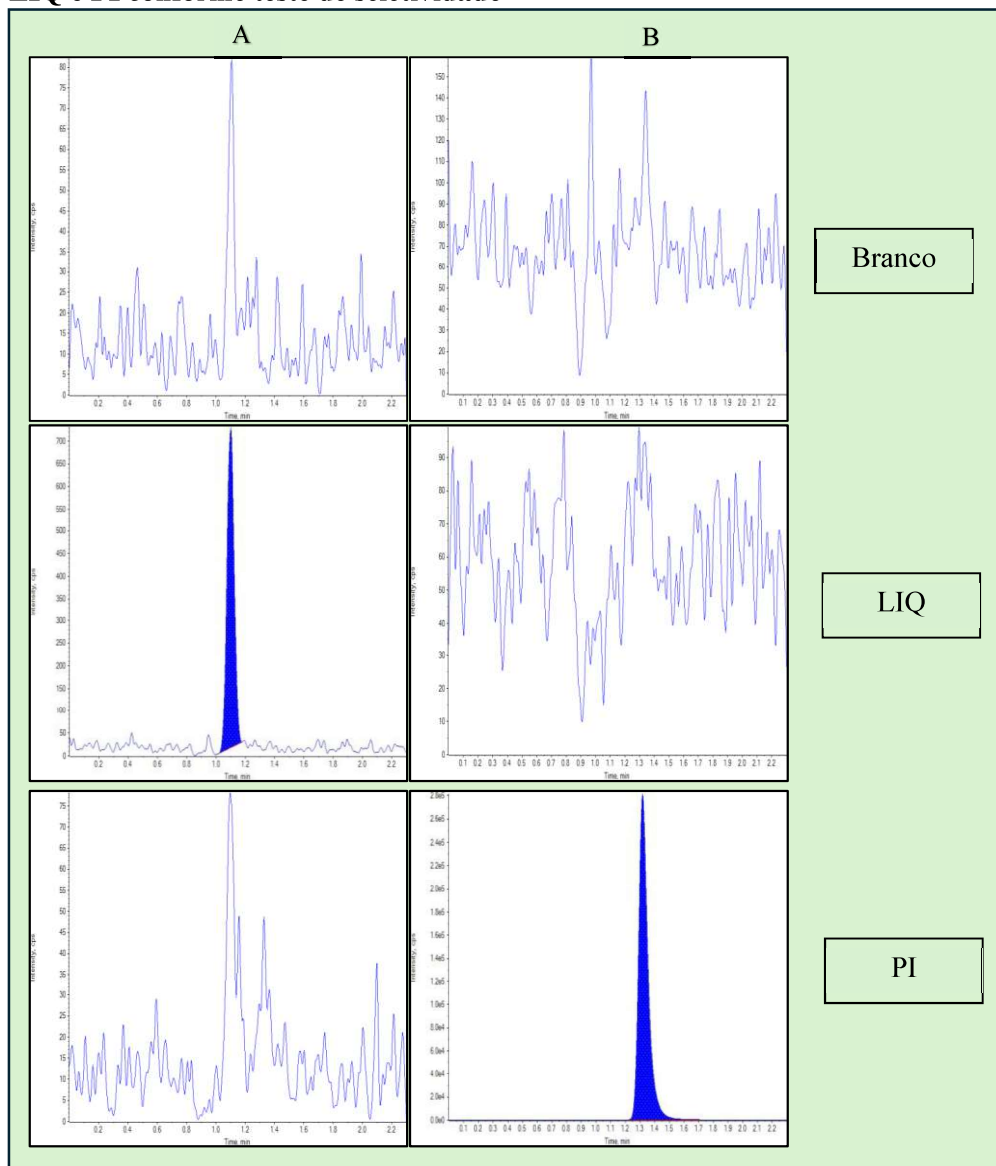
3.2 Testes da validação e resultados gerais dos testes

3.2.1 Seletividade

Nenhuma das amostras apresentou pico interferente no tempo de retenção do ativo ou padrão interno (Figura 2). O pico interferente do analito é caracterizado por um sinal no tempo de retenção do ativo com área $\geq 20\%$ da resposta do analito no LIQ. Já o pico interferente do

padrão interno corresponde a sinais próximos ao seu tempo de retenção com área $\geq 5\%$ da resposta do PI.

Figura 02 - Cromatogramas de olmesartana (A) e candesartana (B) para as amostras branco, LIQ e PI conforme teste de seletividade



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026

Legenda: LIQ – Limite inferior de Quantificação; PI – Padrão interno

3.2.2 Efeito matriz

O fator de matriz normalizado por PI foi em média de 1,98 para amostras de CQA; 1,87 para amostras de CQA + fármacos concomitantes; 2,21 para CQB; e 2,09 para CQB + fármacos concomitantes. O coeficiente de variação para o FMN foi de 8,5%. Os resultados das amostras de CQA e CQB em solução apresentaram área de analito nas concentrações do CQA e CQB

menor que amostras extraídas em plasma devido a um efeito matriz positivo, conforme demonstradas na tabela 03.

Tabela 03 - Média das áreas em solução e em plasma dos controles CQA e CQB

	Amostra	Média da área do analito	Média da área do PI
Amostras em solução	CQA	776206	1.286.114
	CQB	2896	1.387.776
Amostra em plasma	CQA	1453058	1.215.322
	CQA + FC	1383910	1.223.786
	CQB	5886	1.277.511
	CQB + CC	5390	1.236.900

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026

Legenda: FC - Fármacos concomitantes; CQB - Controle de Qualidade de baixa Concentração; CQA - Controle de Qualidade de Alta Concentração

Os resultados obtidos atenderam aos critérios de aceitação da legislação, apesar de a matriz plasmática influenciar com aumento de área para o analito. Embora tenha havido aumento do sinal analítico, a curva de calibração preparada no plasma seria suficiente para conter com sucesso a variação devido ao efeito da matriz, não ocasionando interferência na técnica.

3.2.3 Linearidade e sensibilidade

A avaliação da linearidade e sensibilidade da técnica analítica foi realizada a partir da análise dos resultados das curvas de calibração (tabela 04) com 8 níveis de concentração (2 a 2.000 ng/mL), com ponderação $1/x^2$, r^2 médio de 0,996347 construídas para a olmesartana em matriz plasmática. No limite inferior de quantificação (LIQ), os resultados obtidos para a precisão e exatidão foram de **12,38%** e **5,00%**, respectivamente, confirmando a adequação da técnica para detecção em baixas concentrações.

Tabela 04 – Valores observados para olmesartana em ng.mL⁻¹ nas equações das curvas de calibração e seus respectivos coeficientes de correlação linear

	LIQ	2	3	4	5	6	7	LSQ	C.A	C.L	R ²
CC 1	2.12	5.29	47.59	200.74	532.03	1047.25	1545.39	2062.70	0.000583	0.000135	0.997020
	e 1.97	e 4.96*	e 48.05	e 199.31	e 495.37	e 974.19	e 1717.82	e 2021.97			
CC 2	2.22	5.21	50.27	205.42	535.51	912.46	1694.86	2065.37	0.000313	0.000073	0.994540
	e 1.91	e 5.69	e 48.47	e 209.64	e 587.26 *	e 946.56	e 1570.81	e 2137.73			
CC 3	2.18	5.48	47.05	202.94	537.62	933.90	1674.23	2117.63	0.000794	0.000286	0.994990
	e 1.97	e 5.14	e 53.23	e 199.70	e 524.06	e 1003.69	e 1569.99	e 1977.25			
CC 4	2.19	5.29	48.94	205.92	543.36	1010.63	1555.73	2005.15	0.000792	0.000209	0.996396
	e 1.87	e 6.15	e 50.50	e 194.45	e 530.79	e 947.59	e 1570.32	e 2017.43			
CC 5	2.02	6.36	49.40	193.70	536.58	986.82	1570.98	1929.81	0.000815	0.000109	0.997602
	e 1.93	e 6.15	e 48.57	e 199.12	e 549.25	e 948.90	e 1629.64	e 1891.71			
CC 6	1.96	6.46	49.40	201.79	522.17	935.22	1655.78	1869.77	0.000701	0.000194	0.997532
	e 1.98	e 6.09	e 50.98	e 198.72	e 540.34	e 999.14	e 1552.66	e 1861.33			
Média	2.03	5.76	49.37	200.95	531.55	970.95	1609.02	1996.49	0.000666	0.000168	0.996347
CV%	5.91	8.68	3.42	2.29	2.70	4.08	3.84	4.66	28.98	45.83	0.13
Desvio (%)	1.50	-4.00	-1.26	0.48	6.31	-2.91	0.56	-0.18	--	--	--

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026

Legenda: *- ponto desativado; CC – Concentração observada na Curva de Calibração; CV% - Coeficiente de Variação Percentual; LIQ – Limite Inferior de Quantificação; - LSQ – Limite Superior de Quantificação; CA – Coeficiente Angular; CL – Coeficiente Linear; R² – Coeficiente de determinação

Substituindo os valores obtidos nas equações de calibração, a equação da reta para a olmesartana foi determinada como:

$$Y = 0.000666x + 0.000168$$

onde Y representa a razão de áreas (analito e padrão interno) e X a concentração plasmática da olmesartana. O coeficiente de correlação ($r^2 = 0,996347$) demonstra boa correlação linear entre as variáveis, evidenciando a robustez da técnica analítica para quantificação do fármaco em matriz biológica.

A boa linearidade e a elevada sensibilidade obtidas refletem diretamente nos parâmetros de precisão e exatidão intra e intercorrida apresentados na tabela 05, garantindo que os valores medidos foram consistentes e próximos aos reais em diferentes concentrações e condições de análise. Dessa

forma, a técnica mostrou-se confiável tanto para análises repetidas em um mesmo ensaio quanto em ensaios independentes.

Tabela 05- Precisão e exatidão para olmesartana intracorridas e intercorridas de três corridas analíticas

	Concentração (ng.mL ⁻¹)	LIQ (2)	CQB (6)	CQM (1000)	CQA (1600)	CQD (3200)
Intracorrida (n = 6)	Concentração Corrida 1	2.09	6.40	983.51	1516.31	2921.38
	CV (%)	12.92	4.38	4.38	1.63	1.96
	Desvios (%)	4.5	6.67	-1.65	-5.23	-8.71
	Concentração Corrida 2	2.26	5.71	938.22	1564.72	3144.18
	CV (%)	10.18	7.88	5.94	2.69	3.29
	Desvios (%)	13.00	-4.83	-6.18	-2.21	-1.74
	Concentração Corrida 3	1.94	6.13	909.56	1601.54	3055.05
	CV (%)	11.34	6.69	4.25	1.89	6.37
	Desvios (%)	-3.00	2.17	-9.04	0.10	-4.53
Intercorrida (n = 18)	Concentração média	2.10	6.08	943.76	1560.86	3040.20
	CV (%)	12.38	7.57	5.68	3.05	5.11
	Desvios (%)	5.00	1.33	-5.62	-2.45	-4.99

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026

Legenda: LIQ – Limite Inferior de Quantificação; CQB – Controle de Qualidade Baixo; CQM – Controle de Qualidade Médio; CQA – Controle de Qualidade Alto; CQD – Controle de Qualidade de Diluição; CV – Coeficiente de Variação;

3.2.4 Estabilidades

Os testes de estabilidade realizados no estudo mostraram que nenhuma degradação ou instabilidade foi observada quando as amostras foram armazenadas nas condições descritas na tabela 06. Os desvios (%) obtidos estavam dentro dos critérios de aprovação de 15%. Portanto, os ensaios demonstraram a adequação para aplicações em estudos farmacocinéticos.

Tabela 06- Dados da estabilidade de olmesartana para ECCD, ECD, EPP e ELD

Estabilidade	Controle de qualidade	Média das concentrações de estabilidade (ng.mL ⁻¹)	Desvios (%)
ECCD (6 ciclos)	CQA	1600.38	0.02
	CQB	6.70	11.67
ECD (16.05 horas)	CQA	1446.11	-9.62
	CQB	5.73	-4.50
EPP (71.13 horas)	CQA	1474.62	-7.84
	CQB	6.14	2.33
ELD (111 dias)	CQA	1619.08	1.19
	CQB	6.60	10.00

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026

Legenda: CQB – Controle de Qualidade Baixo; CQA – Controle de Qualidade Alto; ECCD – Estabilidade de Ciclos de Congelamento e Descongelamento; ECD – Estabilidade de Curta Duração; EPP – Estabilidade Pós Processamento; ELD – Estabilidade de Longa Duração

3.2.4.1 Estabilidade de solução padrão em solução

A estabilidade de armazenamento das soluções do ativo e padrão interno foi verificada por um período de 13 dias e a estabilidade de uso foi de 07.05 horas. Os valores obtidos são apresentados na tabela 09.

Tabela 9 – Dados da estabilidade de olmesartana e candesartana para solução padrão em metanol 50%

	Soluções primárias (razão das áreas)				Soluções de trabalho (razão das áreas)			
	Sol. 1ª uso + PI recente	Sol. 1ª recente + PI uso	Sol. 1ª armazen. + PI recente	Sol. 1ª recente + PI armazen.	Sol. trabalho uso + PI recente	Sol. trabalho recente + PI uso	Sol. trabalho armazen. + PI recente	Sol. trabalho recente + PI armazen.
Média	1.045805	1.023925	1.044296	1.033559	0.004740	0.004520	0.004324	0.004379
CV (%)	0.31%	1.38%	0.55%	1.62%	10.66%	2.19%	1.33%	1.42%
Desvio (%)	2.14%		1.04%		4.87%		-1.26%	

Fonte: Elaborado pelo autor, 2026

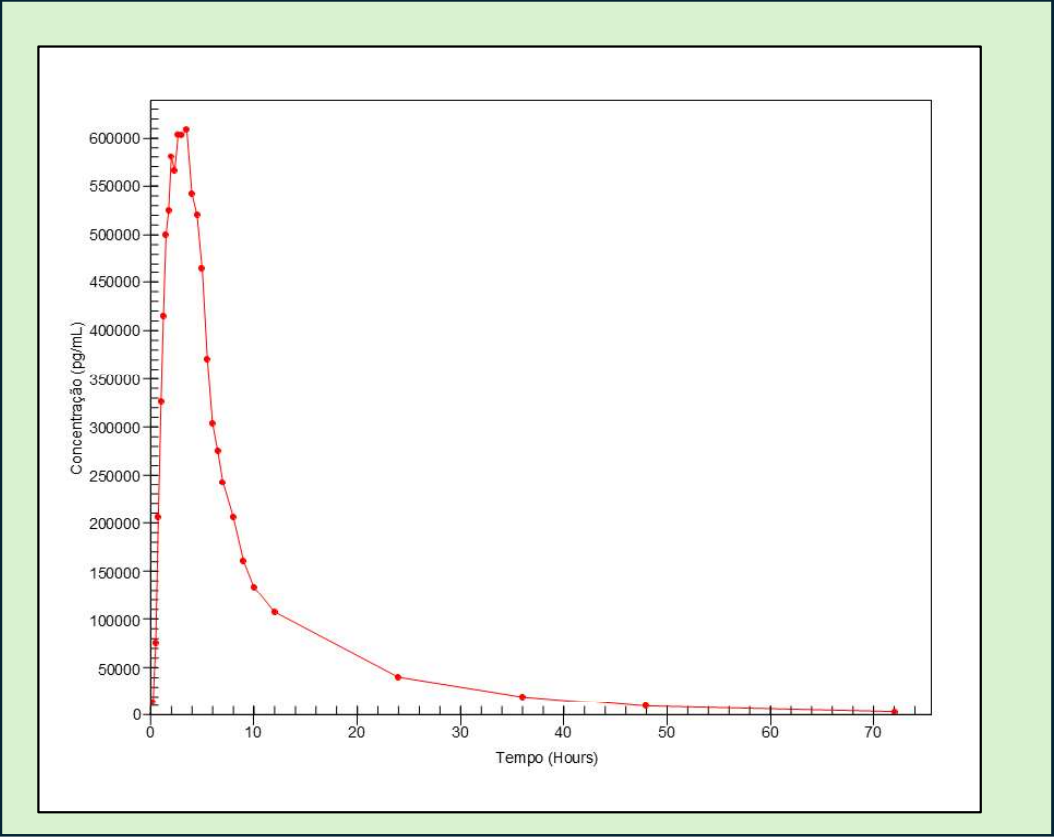
Legenda: 1ª – Primária; armazen. – Armazenamento; PI – Padrão Interno; Sol. - Solução

Os valores se encontram dentro da faixa de aprovação esperada, com desvio inferior a 10% de suas respostas e comparação com as respostas das soluções recentes. Portanto as soluções encontram-se estáveis no intervalo avaliado

3.3 Dados farmacocinéticos

O estudo de bioequivalência tem como objetivo verificar se o tratamento teste de olmesartana medoxomila é bioequivalente, ou seja, apresenta a mesma taxa e extensão de absorção que o tratamento comparador quando administrados em sujeitos sadios sob condição de jejum. O desenho planejado do estudo é: monocêntrico, aberto, cruzado, randomizado, prospectivo, com dois tratamentos (A e B), 2 sequências (AB e BA) 1 subgrupo, 2 períodos e dose única. A curva concentração plasmática média x tempo de uma dose de 40 mg do medicamento e os parâmetros farmacocinéticos do medicamento comparador estão apresentados na imagem 02 e tabela 10 respectivamente. Os dados farmacocinéticos referentes ao medicamento teste não foram incorporados ao estudo em questão, tendo em vista que o patrocinador responsável optou por não conceder autorização para a divulgação dessas informações no contexto da referida publicação.

Imagem 02: Curva de concentração plasmática média (ng.mL⁻¹) versus tempo (h) após administração de uma dose única de comprimido revestido de olmesartana 40 mg em 44 voluntários de ambos os sexos



Fonte: Elaborado pelo autor, 2026

Tabela 10- Parâmetros farmacocinéticos após administração de uma dose única de comprimido revestido de olmesartana 40 mg em 44 voluntários de ambos os sexos

Fármaco	Estatística	C _{max} (ng.mL ⁻¹)	ASC _{0-t} (h.ng.mL ⁻¹)	T _{max} (h)	T _{1/2} (h)	K _{el} (1.h ⁻¹)
Comparador	Média geométrica	846.28	5265.88	2.27	10.01	0.07
	Média	891.17	5471.41	2.67	10.50	0.07
	Mínimo	452.49	2947.31	1.00	5.99	0.03
	Máximo	1646.86	9385.39	12.00	19.94	0.12
	CV (%)	33.08	27.92	74.05	32.87	29.35

Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: C_{max} - Concentração Plasmática Máxima Observada; ASC_{0-t} - Área Sob a Curva de concentração plasmática de zero até o último tempo quantificável; T_{max} - Tempo para atingir a concentração máxima; T_{1/2} - meia-vida de eliminação; K_{el} – Contrante de Eliminação

O perfil gráfico da concentração plasmática versus tempo da imagem 2 apresentou o comportamento típico observado para fármacos administrados por via oral, caracterizado por uma fase inicial de absorção com aumento progressivo das concentrações plasmáticas até atingir concentração máxima, seguida por uma fase de declínio relacionada aos processos de distribuição e eliminação do fármaco

4 Conclusão

A técnica desenvolvida para a quantificação de olmesartana em plasma humano por LC-MS/MS demonstrou ser simples, rápida, sensível e reprodutível. Os parâmetros de validação atenderam aos critérios estabelecidos quanto à linearidade, precisão, exatidão, seletividade e efeito matriz. Os estudos de estabilidade confirmaram que tanto as amostras plasmáticas quanto soluções em metanol 50% permanecem estáveis sob as condições avaliadas, garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos. Além disso, o tempo de corrida foi reduzido em relação a técnicas previamente descritas, o que contribui para maior agilidade e eficiência nas análises, sem comprometer a qualidade dos resultados. Dessa forma, a técnica validada mostrou-se adequada para aplicação em estudos de bioequivalência, possibilitando a análise segura e eficiente da olmesartana em diferentes condições experimentais.

5 Referências

ALANAZI, Samyah. Recent advances in liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) applications in biological and applied sciences. *Analytical Science Advances*, v. 6, n. 1, e70024, 2025. Disponível em: [DOI:10.1002/ansa.70024](https://doi.org/10.1002/ansa.70024). Acesso em: 26 abr. 2026.

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

BRANDÃO, Andréa Araujo et al. Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial – 2025. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, São Paulo, v. 122, n. 9, e20250624, 2025. DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20250624>. Acesso em: 20 abr. 2026.

DAS, Rakesh et al. Method development & validation of LC-MS/MS for atorvastatin and olmesartan in human plasma to trace drug interaction of formulation. *Current Pharmaceutical Analysis*, v. 11, n. 1, p. 43–52, 2015. DOI: 10.2174/1573412910666141021002115.

DE NICOLÒ, A. et al. UHPLC-MS/MS method with protein precipitation extraction for the simultaneous quantification of ten antihypertensive drugs in human plasma from resistant hypertensive patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 129, p. 535–541, 2016. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.07.049.

FU, Y.; LI, W.; PICARD, F. Assessment of matrix effect in quantitative LC-MS bioanalysis. *Bioanalysis*, v. 16, n. 12, p. 631–634, 2024. Disponível em: [DOI:10.4155/bio-2024-0047](https://doi.org/10.4155/bio-2024-0047). Acesso em: 26 abr. 2026.

JEONG, Hyeon-Cheol; SEO, Young-Hee; GU, Na; RHEE, Myung-Yong; SHIN, Kyung-Hoon. Determination of candesartan or olmesartan in hypertensive patient plasma using UPLC-MS/MS. *Translational and Clinical Pharmacology*, v. 29, n. 4, p. 226–238, 2021. DOI: 10.12793/tcp.2021.29e21.

KUMAR, Ajay et al. Development and validation of an LC-ESI-MS/MS method for simultaneous quantification of olmesartan and hydrochlorothiazide in human K3 EDTA plasma and its application to pharmacokinetic biostudy. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, v. 31, n. 1, p. 6–23, 2014. DOI: 10.3109/10601333.2013.849267.

KUMAR, Arvind; DWIVEDI, Surya Prakash; PRASAD, Tulika. Method validation for simultaneous quantification of olmesartan and hydrochlorothiazide in human plasma using LC-MS/MS and its application through bioequivalence study in healthy volunteers. *Frontiers in Pharmacology*, v. 10, p. 810, 2019. DOI: 10.3389/fphar.2019.00810.

LIU, Dongyang et al. Simultaneous quantitative determination of olmesartan and hydrochlorothiazide in human plasma and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 878, n. 9–10, p. 743–748, 2010. DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.01.009.

MANDAL, Swagata et al. Review of extraction and detection techniques for the analysis of pesticide residues in fruits to evaluate food safety and make legislative decisions: challenges and anticipations. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 1215, p. 123587, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123587>.

MANDOUR, Asmaa et al. Sequential liquid-liquid extraction coupled to LC-MS/MS for simultaneous determination of amlodipine, olmesartan and hydrochlorothiazide in plasma samples: Application to pharmacokinetic studies. *Microchemical Journal*, v. 155, p. 104757, 2020. DOI: 10.1016/j.microc.2020.104757.

NETO, A. F. R.; NUNES, D. S. S. *Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

OMBONI, S.; VOLPE, M. Angiotensin Receptor Blockers Versus Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors for the Treatment of Arterial Hypertension and the Role of Olmesartan. *Advances in Therapy*, v. 36, n. 2, p. 278–297, 2019. DOI: 10.1007/s12325-018-0859-x.

Organização Mundial da Saúde. Diretriz para o tratamento farmacológico da hipertensão arterial em adultos. Versão oficial em português da obra original: Guideline for the pharmacological treatment of hypertension in adults. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2021. Disponível em: [PAHO - Diretriz para o tratamento farmacológico da hipertensão arterial em adultos](#). Acesso em: 19 abr. 2026.

PITT, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clinical Biochemistry Reviews*, v. 30, n. 1, p. 19–34, fev. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643089/>. Acesso em: 18 abr. 2026.

QUENTAL, Cristiane; ABREU, José Cláudio de; BOMTEMPO, José Vitor; GADELHA, Carlos Augusto Grabois. Medicamentos genéricos no Brasil: impactos das políticas públicas sobre a indústria nacional. *Ciência & Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v. 13, supl., p. 619–628, 2008. Disponível em: [DOI:10.1590/S1413-81232008000700011](https://doi.org/10.1590/S1413-81232008000700011). Acesso em: 26 abr. 2026.

SCOTT, L. J.; McCORMACK, P. L. Olmesartan medoxomil: a review of its use in the management of hypertension. *Drugs*, v. 68, n. 9, p. 1239–1272, 2008. DOI: 10.2165/00003495-200868090-00005.

SOARES, Glauco C. F. F. Desenvolvimento e validação de método analítico com utilização de dessorção térmica de laser de diodo acoplado à espectrometria de massas para aplicação em um estudo de bioequivalência de lamotrigina. 2025. 66 f. Dissertação (Mestrado em

Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2025.

VAIDYA, V. V. et al. LC–MS–MS determination of olmesartan in human plasma. *Chromatographia*, v. 67, n. 1–2, p. 147–150, 2008. DOI: 10.1365/s10337-007-0453-x.

WEST, Raymond E. III et al. Development and validation of an UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of fexofenadine and olmesartan in human serum: Application to in vivo pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 245, p. 116179, 2024. DOI: 10.1016/j.jpba.2024.116179.

ZHANG, J.; DASGUPTA, A.; AYALA, R.; BONAPACE, C.; KASSIM, S.; FAUSTINO, P. J. Internal standard variability: root cause investigation, parallelism for evaluating trackability and practical considerations. *Bioanalysis*, v. 16, n. 15, p. 771–776, 2024. DOI: 10.1080/17576180.2024.2348939.