

Desenvolvimento e validação de método por CLUE-EM/EM para quantificação simultânea de Losartana e seu metabólito ativo para monitoramento plasmático em pacientes renais.

Autor principal: Alberto Gomes Tavares Junior

Autores colaboradores: Ozzy Moreno de Almeida e Silva; Jeff Murilo Silva de Castro, Lílian Grace da Silva Solon; Esteban Guitián Fernández; Francisco Fábio Oliveira de Sousa

Categoria: Farmacêutico

Dados de correspondência: albertojunior-ap@hotmail.com; [REDACTED]

[REDACTED]

Desenvolvimento e validação de método por CLUE-EM/EM para quantificação simultânea de Losartana e seu metabólito ativo para monitoramento plasmático em pacientes renais.

Resumo: O presente estudo teve como objetivo principal viabilizar o monitoramento terapêutico de Losartana e seu metabólito por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectroscopia de Massas sequencial em pacientes renais crônicos do Estado do Amapá, visando promover a individualização posológica e a otimização dos tratamentos farmacológicos, além de prevenir terapias invasivas e garantir a segurança do paciente. A pesquisa foi realizada no Hospital de Clínicas Alberto Lima (Macapá-AP). No primeiro momento, levantou-se dados de comorbidades e medicamentos utilizados pelos pacientes, resultando como Hipertensão a comorbidade principal e Losartana como medicamento de maior frequência de uso, sendo o mesmo e seu metabólito ativo (Ácido Losartana) selecionados para o desenvolvimento de método capaz de monitorar suas concentrações em plasma humano. Realizou-se a coleta de sangue de cinco paciente renais crônicos que faziam uso de Losartana. O método desenvolvido foi validado analiticamente e bioanaliticamente para a matriz plasma, apresentando linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade, robustez, eficiência de extração e seletividade para os intervalos de concentração de 0,005 – 1 µg/mL para Losartana e de 0,001 – 6 µg/mL para o Ácido Losartana. Na aplicação do método nas amostras dos pacientes, observou-se que 80% dos pacientes apresentaram níveis subterapêuticos de Losartana e do metabólito após a administração da dose de manutenção, demonstrando a necessidade de monitorar este anti-hipertensivo administrado aos pacientes renais, para o controle da pressão arterial, e garantir eficácia e segurança no tratamento farmacológico. Portanto, se apresentou um método simples, rápido e de baixo custo, possibilitando a implementação de protocolos clínicos para o monitoramento da Losartana, Palavras-chave: Doença Renal Crônica. Monitoramento de drogas terapêuticas. CLUE-EM/EM. Losartana. Ácido Losartana,

1. INTRODUÇÃO

As doenças renais se tornaram um grave problema de saúde pública, acometendo grande porcentual da população brasileira e estando correlacionada com a Diabetes Mellitus e a Hipertensão Arterial⁹.

A disfunção dos rins pode gerar danos sistêmicos à saúde do paciente, o que justifica acompanhamento e monitoramento do tratamento destes visando melhorar os resultados clínicos, atrelados a terapia medicamentosa. Entretanto, a farmacocinética dos medicamentos pode ser alterada devido à função renal debilitada, agravados com os danos renais que podem ser causados pela utilização de fármacos nefrotóxicos¹⁰.

Afim de solucionar tais questões clínicas, destaca-se o monitoramento de drogas terapêuticas (TDM – *Therapeutic Drug Monitoring*), área das análises clínicas e toxicológicas que se vulgarizou com a evolução das técnicas bioanalíticas³, um método confiável e eficaz na determinação dos níveis plasmáticos de agentes terapêuticos tais como: antimicrobianos, anticonvulsivantes, imunossuppressores, anti-hipertensivos, dentre outros²⁻⁵⁻⁶⁻⁷.

No estado do Amapá, nenhum hospital da rede pública ou privada oferece o serviço de TDM aos pacientes renais, o que seria uma ferramenta essencial capaz de promover a individualização posológica e a otimização dos tratamentos farmacológicos, além de prevenir terapias invasivas, como a hemodiálise e garantir a segurança do paciente¹¹⁻⁸.

Diante desta problemática, se desenvolveu e validou um método por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectroscopia de Massas sequencial (CLUE-EM/EM) para quantificação simultânea de Losartana e seu metabólito ativo para monitoramento plasmático em pacientes renais crônicos no estado do Amapá.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. SELEÇÃO DOS PACIENTES

O estudo foi desenvolvido no Hospital de Clínicas Dr. Alberto Lima (HCAL) no município de Macapá-AP. Os pacientes renais ambulatoriais cadastrados no HCAL, que consentiram em participar da pesquisa foram entrevistados, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (CAAE nº 76695717.0.0000.0003), respondendo a um questionário semiestruturado para levantamento dos dados sócio-demográficos, comorbidades e medicamentos utilizados. A partir destes resultados foi estabelecido o fármaco a ser monitorado, considerando os seguintes fatores: i) potencial nefrotóxico, ii) a prevalência de uso, iii) a cronicidade de uso e iv) grau de comprometimento dos usuários.

2.2. COLETA DE AMOSTRAS

Para coleta de amostras de sangue, foram convidados pacientes maiores de 18 anos, diagnosticados com Doença Renal Crônica, Hipertensão, e que faziam uso do fármaco Losartana. O protocolo de coleta foi baseado no perfil farmacocinético da Losartana, realizando uma coleta antes da dose de manutenção (concentração de vale) e outra colhida após 1 hora e 15 minutos da administração do fármaco (concentração de pico). O volume de cada amostra foi de 5 ml sendo obtidas por punção venosa, posteriormente centrifugadas (10 minutos, 3000 rpm) para obtenção do plasma e armazenadas em freezer -40°C.

Além da coleta de sangue, foi aferida a pressão arterial e realizado exame de bioimpedância nos pacientes.

2.3. QUÍMICOS E REAGENTES

Os padrões analíticos da Losartana, Ácido Carboxílico Losartana (EXP3174) e Irbesartan (Padrão Interno) foram obtidos da Synfine Research, Inc (Canadá). A acetonitrila

HPLC gradiente foi obtida da Labbox Labware S.L (Espanha) e a acetonitrila HPLC suUpra pura foi obtida da Scharlab S.L (Espanha).

2.4. EQUIPAMENTO E CONDIÇÕES DE ANÁLISES (CLUE - EM/EM)

O equipamento utilizado foi um Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (Agilent), utilizando em sequência um espectrômetro de massas timsTOF (Bruker), com ionização química a pressão atmosférica (APCI *Atmospheric pressure chemical ionization*), analisador de tempo voo (TOF *Time of flight*), modo positivo. As análises foram realizadas no Centro de Apoio Científico-Tecnológico da Universidad de Santiago de Compostela – Espanha.

2.5. PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO E AMOSTRAS DO CONTROLE DE QUALIDADE

A solução estoque de Losartana (500 µg/mL), Ácido Losartana (370 µg/mL) e o padrão interno Irbesartan (500 µg/mL) foram preparados e dissolvidos em acetonitrila HPLC gradiente. As soluções estoque foram armazenadas em freezer -40° C.

A partir das soluções estoque, soluções de trabalho foram preparadas em acetonitrila HPLC gradiente conforme a concentração necessária para as análises através de diluição, fornecendo um intervalo de concentração de calibração de 0,002 – 0,5 µg/mL para Losartana e de 0,005 – 1,5 µg/mL para o Ácido Losartana. As soluções de trabalho foram armazenadas em freezer -40° C.

Seis amostras de controle de qualidade foram preparadas em acetonitrila a partir das soluções de trabalho, nas concentrações de 1,5 µg/mL, 0,75 µg/mL e 0,025 µg/mL para Losartana e de 2,775 µg/mL, 0,925 µg/mL e 0,278 µg/mL para o Ácido Losartana.

Para análise dessas amostras, foram injetados 2µL no equipamento.

2.6. PREPARO DAS AMOSTRAS DE PLASMA HUMANO FORTIFICADAS (“SPIKE”)

Alíquotas de 300 µL de plasma branco foram fortificadas com as soluções de trabalho contendo Losartana (20 µL), Ácido Losartana (20 µL) e Irbesartan (20 µL), nas concentrações necessárias fornecendo um intervalo de concentração de calibração de 0,005 – 1 µg/mL para Losartana e de 0,001 – 6 µg/mL para o Ácido Losartana e dos controles de qualidade, nas concentrações de 1,5 µg/mL, 0,75 µg/mL e 0,025 µg/mL para Losartana e de 2,775 µg/mL, 0,925 µg/mL e 0,278 µg/mL para o Ácido Losartana. Adicionalmente, 300 µL de acetonitrila HPLC gradiente foram adicionados em cada alíquota e, posteriormente, centrifugadas (10 min, 3000 RPM) para filtração do sobrenadante em filtro de seringa (0,45 µm) e injeção de 2µL no equipamento.

2.7. PREPARO DAS AMOSTRAS DE PLASMA DOS PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS

Alíquotas de 300 µL do plasma dos voluntários foram fortificadas apenas com a solução de trabalho contendo o padrão interno. Adicionalmente, 340 µL de acetonitrila HPLC gradiente foram adicionados em cada alíquota e, posteriormente, centrifugadas (10 min, 3000 RPM) para filtração do sobrenadante em filtro de seringa (0,45 µm) e injeção de 2µL no equipamento.

2.8. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O método analítico e bioanalítico desenvolvido foi validado conforme as normas vigentes da Resolução RDC nº166, de 24 de Julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA¹. Linearidade, Precisão (Repetibilidade), Exatidão, Limites de Quantificação e Detecção, Seletividade, Robustez e Recuperação foram avaliados.

3. RESULTADOS

3.1. SELEÇÃO DOS PACIENTES

No total, 43 pacientes renais crônicos ambulatoriais foram entrevistados, obtendo informações das comorbidades associadas (**Figura 1**) e perfil de utilização de medicamentos (**Tabela 1**).

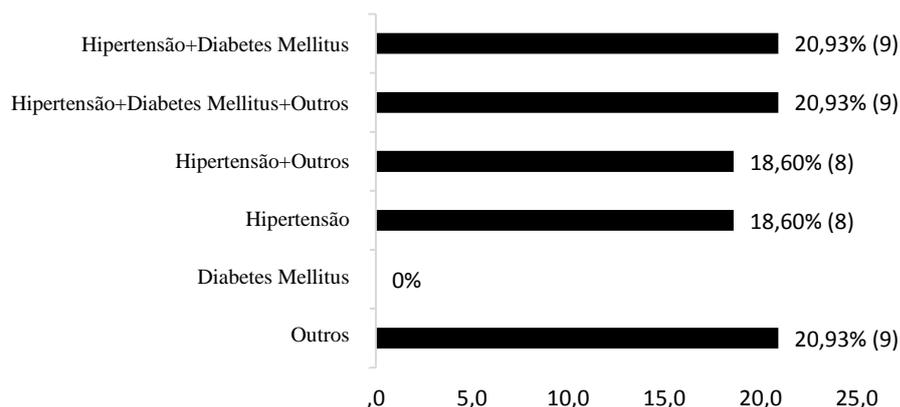


Figura 1. Distribuição das comorbidades associadas à doença renal dos pacientes renais crônicos ambulatoriais (n=43).

Tabela 1. Medicamentos utilizados pelos pacientes renais crônicos ambulatoriais entrevistados.

Fármaco	ATCC	Frequência (%)	n
Losartana	C09CA01	15,79	18
Prednisona	A07EA03	5,26	6
Furosemida	C03CA01	4,39	5
Hidroclorotiazida	C03AA03	4,39	5
Ramipril	C09AA05	4,39	5
Valsartana	C09CA03	4,39	5
Ácido Acetilsalicílico	B01AC06	3,51	4
Anlodipina	C09AA05	3,51	4
Atenolol	C07AB03	3,51	4
Insulina	A10A	3,51	4
Metformina	A10BA02	3,51	4
Nifedipino	C08CA05	3,51	4
Propatilnitrato	C01DA07	2,63	3
Sinvastatina	C10AA01	2,63	3
Citrato de Potássio	A12BA02	1,75	2
Enalapril	C09AA02	1,75	2

Glibenclamida	C09AA02	1,75	2
Omeprazol	A02BC01	1,75	2
Sitagliptina	A10BH01	1,75	2
Outros		26,32	30
Total		100	84

A partir da análise de comorbidades associadas e do perfil de utilização de medicamentos, selecionou-se a Losartana e o seu metabólito ativo Ácido Carboxílico Losartana (EXP3174) para proceder a sua validação analítica/bioanalítica e monitoramento terapêutico.

Dos 18 pacientes convidados para o monitoramento terapêutico, apenas 5 compareceram ao dia da coleta de sangue. O protocolo de coleta foi seguido, além da aferição da pressão arterial 40 minutos após a administração da Losartana e avaliação por bioimpedância (**Tabela 2**).

Tabela 2. Avaliação por bioimpedância e características (sexo, idade, pressão arterial) dos pacientes renais crônicos não-dialíticos que participaram do monitoramento plasmático da Losartana.

Paciente	P1	P2	P3	P4	P5
Sexo	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Masculino
Idade	50	58	62	75	48
Pressão arterial	142x91*	144x75*	148x88*	191x86*	154x95*
Peso (Kg)	75,4	94	69,2	55,2	66,8
IMC	28,7*	41,8*	28,8*	24,5	26,8*
Gordura corporal (%)	40,9*	54*	41,8*	34,7	27*
Musculo esquelético (%)	25,8	20,5*	25,1	27,2	34,4
Metabolismo Basal	1460	1583	1359	1202	1557
Idade Corporal	58*	80*	67*	66	40
Gordura visceral	9	15*	10*	9	12*

*Valores fora do intervalo de normalidade dos parâmetros avaliados

3.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

3.2.1. VALIDAÇÃO ANALÍTICA

3.2.1.1. Linearidade, precisão e exatidão

A linearidade do método desenvolvido em CLUE – EM/EM foi calculada com base na relação concentração do analito *versus* área do analito, conforme o intervalo de concentração de calibração estabelecido para Losartana e Ácido Losartana em acetonitrila HPLC gradiente (**Tabela 3**).

Tabela 3. Equação linear e coeficiente de determinação obtida a partir dos padrões analíticos de Losartana e Ácido Losartana (EXP3174) em acetonitrila HPLC gradiente.

Analito	Equação Linear	R²
Losartana	$y = 2 \cdot 10^7 x - 9021,5$	1
EXP3174	$y = 1 \cdot 10^7 x - 257159$	0,9966

As amostras de controle de qualidade preparas com as soluções de trabalho foram utilizadas para o ensaio de precisão e exatidão, conforme os dados expostos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Precisão (CV %), Exatidão (%) e Erro Padrão Relativo (%) do método CLUE-EM/EM para determinação das concentrações de Losartana e Ácido Losartana (EXP3174) em acetonitrila HPLC gradiente.

Analito	Concentração adicionada (µg/ml)	Concentração mensurada (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)	EPR (%)
Losartana	1,51 ¹	1,39 ± 0,05	4,22	92,80	-7,20
	0,75 ²	0,770 ± 0,03	4,89	102,69	2,69
	0,025 ³	0,025 ± 0,0007	3,08	99,40	-0,60
EXP3174	2,775 ¹	2,541 ± 0,04	1,59	91,58	-8,42
	0,925 ²	0,827 ± 0,02	3,29	89,42	-10,58
	0,278 ²	0,247 ± 0,001	0,50	88,85	-11,15

¹Concentração Alta; ²Concentração Média; ³Concentração Baixa. Resultados expressos em Média (n=3) ± Desvio Padrão

3.2.1.2. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

O método desenvolvido demonstrou limite de detecção em 0,002 µg/mL para Losartana e 0,004 µg/mL para o Ácido Losartana. Enquanto que os limites de quantificação foram de 0,005 µg/mL para Losartana e 0,01 µg/mL para o metabólito ativo.

3.2.1.3. Robustez

A robustez do método foi avaliada através da alteração do solvente principal, utilizando para este parâmetro Acetonitrila HPLC supra pura (**Tabela 5**).

Tabela 5. Robustez do método CLUE-EM/EM para determinação das concentrações de Losartana e Ácido Losartana (EXP3174) em Acetonitrila HPLC supra pura.

Concentração adicionada (µg/mL)		Concentração mensurada (µg/mL)			
Losartana	EXP3174	Losartana	Variação (%)	EXP3174	Variação (%)
0,75	0,925	0,68 ± 0,04	-8,35	0,849 ± 0,02	-8,15

Resultados expressos em Média (n=3) ± Desvio Padrão

3.2.2. VALIDAÇÃO BIOANALÍTICA

3.2.2.1. Linearidade, precisão e exatidão

Assim como na validação analítica, o método desenvolvido avaliou o parâmetro pela relação concentração do analito *versus* área do analito, conforme o intervalo de concentração de calibração estabelecido para Losartana e Ácido Losartana em plasma humano (**Tabela 6**).

Tabela 6. Equação linear e coeficiente de determinação obtida a partir dos padrões analíticos de Losartana e Ácido Losartana (EXP3174) em plasma humano.

Analito	Equação Linear	R²
Losartana	$y = 2 \cdot 10^7 x + 3836,3$	1
EXP3174	$y = 7 \cdot 10^6 x - 88956$	0,9974

As amostras de controle de qualidade preparas com plasma humano fortificados com as soluções de trabalho foram utilizadas para o ensaio de precisão e exatidão, conforme os dados expostos na **Tabela 7**.

Tabela 7. Precisão (CV %), Exatidão (%) e Erro Padrão Relativo (%) do método CLUE-EM/EM para determinação das concentrações de Losartana e Ácido Losartana (EXP3174) em plasma humano.

Analito	Concentração adicionada (µg/ml)	Concentração mensurada (µg/ml)	CV %	Exatidão (%)	EPR (%)
Losartana	1,5 ¹	1,52 ± 0,14	9,20	101,67	1,67
	0,75 ²	0,85 ± 0,01	1,43	113,51	13,51
	0,025 ³	0,027 ± 0,002	7,37	110,37	10,37
EXP3174	2,775 ¹	2,503 ± 0,16	6,60	90,20	-9,80
	0,925 ²	0,811 ± 0,004	0,52	87,69	-12,31
	0,278 ³	0,236 ± 0,005	2,29	85,07	-14,93

¹Concentração Alta; ²Concentração Média; ³Concentração Baixa. Resultados expressos em Média (n=3) ± Desvio Padrão

3.2.2.2. Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

A validação bioanalítica demonstrou, em meio a matriz biológica plasma, o limite de detecção em 0,0005 µg/mL para Losartana e 0,002 µg/mL para o Ácido Losartana. Enquanto que os limites de quantificação foram de 0,005 µg/mL para Losartana e 0,005 µg/mL para o Ácido Losartana.

3.2.2.3. Robustez

O parâmetro robustez na presença da matriz biológica com a alteração do solvente principal, foi realizado utilizando Acetonitrila HPLC supra pura (**Tabela 8**).

Tabela 8. Robustez do método CLUE-EM/EM para determinação das concentrações de Losartana e Ácido Losartana (EXP3174) em plasma humano utilizando Acetonitrila HPLC supra pura.

Concentração adicionada (µg/mL)		Concentração mensurada (µg/mL)			
Losartana	EXP3174	Losartana	Variação (%)	EXP3174	Variação (%)
0,75	0,925	0,81 ± 0,23	8,67	0,935 ± 0,099	-1,11

Resultados expressos em Média (n=3) ± Desvio Padrão

3.2.2.4. Seletividade

Para avaliar este parâmetro, utilizou-se como matriz biológica o plasma normal, lipêmico e hemolisado, conforme os resultados (**Tabela 9**).

Tabela 9. Seletividade do método LC-MS para determinação das concentrações de Losartana e Ácido Carboxílico Losartana (EXP3174) em amostras de plasma normal, lipêmico e hemolisado.

Amostras	Concentração adicionada (µg/mL)		Concentração mensurada (µg/mL)			
	Losartana	EXP3174	Losartana	Variação (%)	EXP3174	Variação (%)
Plasma Normal	0,75	0,925	0,77 ± 0,03	2,74	0,860 ± 0,09	-6,95
Plasma Lipêmico	0,75	0,925	0,79 ± 0,94	5,99	0,941 ± 0,23	1,74
Plasma Hemolisado	0,75	0,925	0,83 ± 0,04	11,348	0,908 ± 0,02	-1,77

Resultados expressos em Média (n=3) ± Desvio Padrão

3.2.2.5. Recuperação

Para avaliar a eficiência da extração do método, utilizou-se as amostras de controle de qualidade e suas respectivas concentrações mensuradas na validação analítica e bioanalítica. As amostras do controle de qualidade preparadas em acetonitrila HPLC gradiente (amostras não extraídas), representaram 100% da recuperação, enquanto as amostras do controle de qualidade em plasma (amostras extraídas) tiveram seus respectivos percentuais de recuperação calculados (**Tabela 10**).

Tabela 10. Recuperação do método CLUE-EM/EM para determinação de eficiência de extração de Losartana e Ácido Carboxílico Losartana (EXP3174) em amostras de plasma humano.

Concentrações mensuradas			
Analito	Amostras não extraídas	Amostras extraídas	Recuperação (%)
Losartan	1,39 ¹	1,52 ¹	109,55
	0,77 ²	0,85 ²	110,53
	0,024 ³	0,027 ³	111,02
EXP3174	2,541 ¹	2,503 ¹	98,49
	0,827 ²	0,811 ²	98,06
	0,246 ³	0,236 ³	95,74

¹Concentração Alta; ²Concentração Média; ³Concentração Baixa

3.3. AMOSTRAS DE PLASMAS DOS PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS

Os analitos Losartana e seu metabólito foram quantificados nas amostras coletadas dos pacientes renais crônicos (n=5), separando as amostras que foram coletas antes da administração do fármaco das que foram coletadas após a administração do mesmo (**Tabela 11**).

Tabela 11. Concentrações médias de Losartana e Ácido Carboxílico Losartânico (EXP3174) determinadas através do método de CLUE-EM/EM em amostras de plasma humanos de 5 voluntários (n = 5). Doses orais de 50 ou 100 mg de Losartana foram administradas por via oral antes da coleta das amostras

Amostra do paciente		P5	P23	P25	P37	P38
Dose (mg)		50	100	50	50	100
Losartana	Antes da administração (µg/ml)	Não detectado	0,0045 ± 0,0010*	0,00013 ± 0,0002*	0,0041 ± 0,0007*	Não detectado
	Após administração (µg/ml)	0,1282 ± 0,0085*	0,0229 ± 0,0005*	0,1426 ± 0,0281*	0,2426 ± 0,0723	0,0173 ± 0,0017*
EXP3174	Antes da administração (µg/ml)	Não detectado	0,2442 ± 0,0205	0,0112 ± 0,0035**	0,0029 ± 0,0008**	0,0152 ± 0,0028**
	Após administração (µg/ml)	0,4187 ± 0,0096	0,1954 ± 0,0008**	0,1636 ± 0,0138**	0,0070 ± 0,0012**	0,0127 ± 0,001**

Os resultados foram calculados usando a curva de calibração e expressos pela média ± desvio padrão. *Valores fora da janela terapêutica da Losartana (0,2 – 0,65 µg/ml); **Valores fora da janela terapêutica do EXP3174 (0,2 – 1,2 µg/ml);.

4. DISCUSSÃO

Analisando o perfil sociodemográfico e as comorbidades associadas (**Figura 1**) aos 43 pacientes renais crônicos ambulatoriais, observou-se que a maioria das pacientes era do sexo feminino, hipertensa e consumidora de um maior número de medicamentos. Em relação aos medicamentos utilizados pelos pacientes, nota-se que neste grupo estão presentes a losartana (18), valsartana (5), furosemida (5), ramipril (5), hidroclorotiazida (5) e ácido acetilsalicílico (4), notoriamente fármacos utilizados no tratamento anti-hipertensivo, uma das principais doenças de base e também consequências da doença renal, o que corrobora com os dados da **Figura 1** e justificando a escolha do fármaco Losartana para o monitoramento terapêutico.

A validação analítica do método CLUE-EM/EM preparou a técnica para receber as amostras com plasma, as curvas de calibração, dentro dos intervalos de concentração estabelecidos (item 2.5), foram lineares para todos os analitos alvo, com coeficiente de determinação maior que 0,99, dentro dos parâmetros legalmente exigidos. Conforme os dados expostos na **Tabelas 4**, o método se demonstrou preciso, com valores de CV entre 0,50 e 4,89% (máximo de 15%), e com a precisão estabelecida, os resultados do parâmetro exatidão foram favoráveis, uma vez que os valores variaram entre 88,85 – 102,69% (mínimo de 60%) e os de EPR entre -11,15 – 2,69% (aceitando a margem de $\pm 15\%$), atendendo a legislação utilizada. Os baixos limites de detecção e quantificação da Losartana (LD 0,002 $\mu\text{g/mL}$; LQ 0,005 $\mu\text{g/mL}$) e Ácido Losartana (LD 0,004 $\mu\text{g/mL}$; LQ 0,01 $\mu\text{g/mL}$), confirmaram a alta sensibilidade do método desenvolvido por CLUE-EM/EM. Além de linear, preciso, exato e sensível, o método foi robusto com a alteração da pureza do solvente Acetonitrila, apresentando baixas variações na mensuração analítica entre -8,35 e -8,15 (aceitando a margem de $\pm 15\%$).

A validação bioanalítica do método desenvolvido confirmou a eficácia do desempenho analítico. As curvas de calibração desenvolvidas na fase bioanalítica apresentaram uma forte relação linear, com o valor de R^2 maior que 0,99 e atendendo aos intervalos de concentrações estabelecidos para a matriz biológica. O método também alcançou os parâmetros mínimos de precisão e exatidão, com valores de CV entre 0,52 e 9,20% (máximo de 15%), e exatidão com valores que variaram entre 85,07 – 113,51% (mínimo de 60%) e os de EPR entre -14,93 – 13,51% (aceitando a margem de $\pm 15\%$), demonstrando assim a concordância entre o valor adicionado no plasma e o valor mensurado pelo método. Os limites de detecção e quantificação da Losartana (LD 0,0005 $\mu\text{g/mL}$; LQ 0,005 $\mu\text{g/mL}$) e Ácido Losartana (LD 0,002 $\mu\text{g/mL}$; LQ 0,005 $\mu\text{g/mL}$) permaneceram baixos quando determinados em meio biológico, confirmando a alta sensibilidade em plasma humano. O parâmetro robustez na etapa bioanalítica, também apresentou baixas variações na mensuração analítica entre -1,1 e 8,67 (aceitando a margem de $\pm 15\%$), afirmando que mesmo em matriz plasma foi capaz de suportar a modificação do solvente. Os dados da **Tabela 9** demonstraram a seletividade do método para quantificação dos analitos em variáveis do plasma humano (lipêmico ou hemolisado), uma vez que as mensurações nas diferentes matrizes variaram de - 6,95 – 11,348 (aceitando a margem de $\pm 15\%$). O último parâmetro a ser avaliado foi a Recuperação, a comparação entre amostras não extraídas com amostras extraídas (**Tabela 10**) revelou a eficiência de extração do método, apresentando grandes taxas variando em 98,06 – 111,02% (próximos a 100%). Cabe ressaltar que a Losartana e seu metabólito apresentam taxa de ligação a proteínas plasmáticas $\geq 99\%$ ⁴, e apesar disso o método conseguiu apresentar eficiência na extração dos analitos.

Em relação aos voluntários, os dados de composição corporal dos pacientes que foram submetidos ao monitoramento plasmático da Losartana evidenciaram que alguns pacientes ainda que 40 minutos após a tomada do medicamento apresentaram níveis

pressóricos elevados, em um dos casos chegando à 191x86 mmHg, o que demonstra de realizar um ajuste posológico do referido medicamento. Detectou-se também que 80% dos pacientes apresentou sobrepeso ou obesidade, indicando a necessidade de um acompanhamento nutricional e a implementação de medidas efetivas de controle de peso, uma vez que este atrelado ao excesso de gordura corporal e visceral (detectado 100 e 80% dos pacientes, respectivamente) estariam associados a uma série de agravos, tais como o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e/ou Diabetes mellitus.

Na **Tabela 11** encontram-se os valores de Losartana e Ácido losartana encontrados antes e após a administração da dose de medicamento de cada paciente. Pode-se observar que 80% dos pacientes apresentaram níveis plasmáticos inadequados de Losartana (níveis subterapêuticos) e 80% também do metabólito após a administração. As doses subterapêuticas mensuradas corroboram com os dados da **Tabela 2**, podendo justificar os níveis pressóricos elevados já que os valores de Losartana estão fora da janela terapêutica, sendo sugerido um ajuste posológico ou troca de fármaco. Demonstra-se, portanto a necessidade de monitorar este medicamento anti-hipertensivo administrado aos pacientes renais, tanto pelo controle inadequado da pressão arterial citado acima, assim como pelo risco de acúmulo ou de sobrepassar os níveis terapêuticos desejáveis, visto que a função renal debilitada pode alterar a depuração do fármaco.

5. CONCLUSÃO

O método desenvolvido por CLUE-EM/EM nesse estudo, foi adequado para quantificação de Losartana e Ácido Carboxílico Losartana em plasma humano, sendo considerado simples, rápido e de baixo custo. Os parâmetros de validação destacaram um método linear, sensível, repetível, exato, robusto, seletivo e com excelente eficiência de extração, respeitando a regulamentação vigente.

A metodologia desenvolvida cria possibilidades para implantação de protocolos clínicos que visem o monitoramento terapêutico de Losartana, otimizando o tratamento farmacológico de pacientes renais, trazendo eficiência e segurança no tratamento do mesmo. É possível fazer do monitoramento deste fármaco parte da rotina dos laboratórios de análises clínicas, uma vez que a coleta de sangue é uma prática protocolada, segura e de fácil processamento da matriz.

A partir dos achados, foi possível demonstrar a importância do monitoramento terapêutico na condução das terapias farmacológicas para os pacientes renais crônicos do Hospital de Clínicas Dr. Alberto Lima (HCAL) no município de Macapá, de modo a melhorar a qualidade de vida dos pacientes e reduzir os gastos provenientes do SUS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n°. 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 25 julho 2017.
2. COUCHMAN, L.; FISHER, D. S.; SUBRAMANIAM, K.; HANDLEY, S. A.; BOUGHTFLOWER, R. J.; BENTON, C. M.; FLANAGAN, R. J. Ultra-fast LC-MS/MS in therapeutic drug monitoring: quantification of clozapine and norclozapine in human plasma. *Drug Test Anal*, p. 1-7, 2017.
3. DA SILVA, D. F. M. D. Monitorização Terapêutica de Fármacos: relevância clínica e forense. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina). 44f. Faculdade de Medicina, Universidade de Porto. Porto, 2014.
4. FERNANDES, G. O. R.; FERNANDES, D. R.; CAVALCANTE FILHO, R. D.; TERRA JÚNIOR, A. T. Efeitos farmacológicos decorrentes ao bloqueio dos receptores AT1. *Rev Cient Fac Educ e Meio Ambiente [Internet]*, v. 8, n. 2, p. 138-150. 2017.
5. GILS, A. Combining Therapeutic Drug Monitoring with Biosimilars, a Strategy to Improve the Efficacy of Biologicals for Treating Inflammatory Bowel Diseases at an Affordable Cost. *J Dig Dis*, v. 35, n. 1–2, p. 61–68, 2017.
6. LIU, L.; ZHOU, X.; WU, T.; JIANG, H.; YANG, S.; ZHANG, Y. Dose optimisation of voriconazole with therapeutic drug monitoring in children: a single-centre experience in China. *Int J Antimicrob Agents*, v. 49, n. 4, p. 483–487, 2017.
7. PINDER, N.; BRENNER, T.; SWOBODA, S.; WEIGAND, M. A.; HOPPE-TICHY, T. Therapeutic drug monitoring of beta-lactam antibiotics – influence of sample stability on the analysis of piperacillin, meropenem, ceftazidime and flucloxacillin by HPLC-UV. *J Pharm Biomed Ana*, v. 143, p. 86–93, 2017.
8. RICHARDS, P. G.; DANG, K. M.; KAUFFMAN, C. A.; STALKER, K. L.; SUDEKUM, D.; KERR, L.; BRINKER-BODLEY, M.; CHERIYAN, B.; WEST, N.; COLLINS, C. D.; POLEGA, S.; MALANI, A. N. Therapeutic drug monitoring and use of an adjusted body weight strategy for high-dose voriconazole therapy. *J Antimicrob Chemother*, v. 72, p. 1178–1183, 2017.
9. SILVA, U. D. A. Avaliação dos riscos associados a medicamentos e o impacto do seguimento farmacoterapêutico em pacientes renais do estado do amapá. 69f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amapá-UNIFAP. Macapá, 2017.

10. Silverthorn, D. U. Fisiologia Humana: uma abordagem integrada. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

11. STOTT, K. E.; HOPE, W. W. Therapeutic drug monitoring for invasive mould infections and disease: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *J Antimicrob Chemother*, v. 72, n. suppl_1, p. i12–i18, 2017.