



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA**



**PAULA GIOVANA SANTOS FERREIRA**

**MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO ACICLOVIR EM  
FORMULAÇÕES LIPÍDICAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA**

**OURO PRETO**

**2025**

PAULA GIOVANA SANTOS FERREIRA

**MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ACICLOVIR EM  
FORMULAÇÕES LIPÍDICAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA**

Trabalho de Conclusão de Curso a ser apresentado como  
requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em  
Farmácia pela Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Morais Ruela

**OURO PRETO**

**2025**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
REITORIA  
ESCOLA DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Paula Giovana Santos Ferreira**

### **Métodos analíticos para quantificação do aciclovir em formulações lipídicas de liberação modificada**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia

Aprovada em 18 de março de 2025

#### Membros da banca

Doutor - André Luís Morais Ruela - Orientador Universidade Federal de Ouro Preto  
Doutora - Fernanda Karoline Vieira da Silva Torchelsen - Universidade Federal de Ouro Preto  
Mestra - Lorena Kelly Santiago Ramos - Universidade Federal de Ouro Preto

André Luís Morais Ruela, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 18/03/2025



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luis Morais Ruela, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 18/03/2025, às 19:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0877601** e o código CRC **206AC208**.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, a quem dedico minha mais profunda gratidão. Sua presença foi minha fonte inesgotável de força, sabedoria e inspiração diária.

Ao meu orientador, André, cuja paciência e dedicação foram fundamentais para a realização deste projeto. Obrigada por cada ensinamento, pela disponibilidade em me atender e me auxiliar, e pela confiança depositada em meu potencial. Sua orientação serena e encorajadora foi crucial para que este trabalho se desenvolvesse como planejado.

Aos meus pais, Paulo e Rosângela, não existem palavras suficientes para expressar meu reconhecimento e amor. Vocês foram, e sempre serão, minha maior inspiração e fonte de força. Obrigada por acreditarem em mim incondicionalmente, por me lembrarem que sou capaz e por serem pilares sólidos em minha vida. Se hoje sou uma mulher forte e realizada como farmacêutica, devo isso ao exemplo de dedicação, amor e coragem que sempre me ofereceram. Meu coração se enche de orgulho por ser parte de vocês.

Aos meus irmãos, Caio e Gabriel, agradeço pelo companheirismo, pela amizade e pelo apoio em cada passo desta jornada. Vocês foram minha fonte de alegria e leveza nos momentos difíceis.

Aos meus amigos, que tornaram esta trajetória mais leve e enriquecedora, minha gratidão sincera. Em especial, a Bruna, Ramon e Thais, meus companheiros de curso, que estiveram ao meu lado nessa jornada. Obrigada por compartilharem comigo as alegrias, os desafios e as conquistas que vivenciamos juntos.

Por fim, dedico um especial agradecimento à Escola de Farmácia de Ouro Preto, instituição que me acolheu e foi palco do meu crescimento pessoal e profissional. Sou grata a todos os professores que, com dedicação e excelência, compartilharam seus conhecimentos e contribuíram para minha formação como farmacêutica.

A todos vocês, que direta ou indiretamente fizeram parte dessa caminhada, deixo meu mais sincero agradecimento. Sem o apoio, a sabedoria e o amor de cada um, esse momento não teria chegado.

Ao apoio da Laboratório Multiusuário 1 do PPG CiPharma, ao Laboratório de Controle de Qualidade do PPG CiPharma, à Fapemig e UFOP.

Obrigada!

## RESUMO

O aciclovir é um derivado da guanina com uma cadeia lateral acíclica. É clinicamente administrado como agente antiviral e é bem tolerado por humanos. A absorção oral do aciclovir é baixa (biodisponibilidade variando de 10 a 30%), o que está relacionado ao próprio fármaco e não ao seu veículo de liberação. A classificação do aciclovir como fármaco da Classe III (altamente solúvel e pouco permeável) foi sugerida de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). Quando necessária terapia antiviral com aciclovir em altas doses, a via intravenosa se faz necessária. As formulações parenterais estéreis disponíveis comercialmente no Brasil contêm aciclovir sódico. **Por isso, é interessante desenvolver formulações orais para liberação modificada do aciclovir, possivelmente aumentando a biodisponibilidade do fármaco por uma via menos invasiva.** Para isso, é necessária a quantificação do aciclovir nestas formulações. Os ensaios de liberação *in vitro* são ferramentas importantes no delineamento de formulações inovadoras, e, por isso, a necessidade de métodos analíticos validados conforme a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é de suma importância. Deste modo, o objetivo deste projeto é desenvolver e validar métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV) e espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV-vis) para análise do aciclovir nas etapas de desenvolvimento farmacotécnico que exigem a caracterização, como doseamento e ensaios de liberação *in vitro*. Os resultados indicaram que a espectrofotometria na região do UV-Vis não apresentou seletividade, podendo haver a interferência da impureza guanina na análise dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs) e dos excipientes usados na formulação lipídica para liberação prolongada. O método por CLAE-UV permitiu a quantificação do aciclovir e da guanina nos IFAs e o doseamento do aciclovir nas formulações desenvolvidas, demonstrando seletividade, linearidade, precisão e exatidão, conforme a RDC 166/2017. Sendo assim, os resultados esperados foram alcançados, podendo o método por CLAE-UV ser aplicada como uma ferramenta prática durante o desenvolvimento farmacotécnico de novos medicamentos contendo aciclovir.

**Palavras-chave:** Aciclovir, Cromatografia, Espectrofotometria, Ultravioleta, Liberação, Validação.

## ABSTRACT

Acyclovir is a guanine derivative with an acyclic side chain. It is clinically administered as an antiviral agent and is well tolerated by humans. Oral absorption of acyclovir is low (bioavailability ranging from 10 to 30%), which is related to the drug itself and not to its delivery vehicle. The classification of acyclovir as a Class III drug (highly soluble and poorly permeable) has been suggested according to the Biopharmaceutical Classification System (BCS). When antiviral therapy with high doses of acyclovir is required, the intravenous route is necessary. The sterile parenteral formulations commercially available in Brazil contain acyclovir sodium. Therefore, it is interesting to develop oral formulations for modified release of acyclovir, possibly increasing the bioavailability of the drug by a less invasive route. For this, it is necessary to quantify acyclovir in these formulations. *In vitro* release assays are important tools in the design of innovative formulations, and therefore, the need for validated analytical methods according to the Collegiate Board Resolution (RDC) 166/2017 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA) is of utmost importance. Thus, the objective of this project is to develop and validate analytical methods by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detector (HPLC-UV) and spectrophotometry in the ultraviolet and visible (UV-vis) region for the analysis of acyclovir in the stages of pharmaceutical development that require characterization, such as dosage and *in vitro* release assays. The results indicated that spectrophotometry in the UV-Vis region did not show selectivity, and there may be interference from the guanine impurity in the analysis of active pharmaceutical ingredients (APIs) and excipients used in the formulation for extended release. The HPLC-UV methodology allowed the quantification of acyclovir and guanine in the APIs and the dosage of acyclovir in the developed formulations, demonstrating selectivity, linearity, precision and accuracy, according to RDC 166/2017. Therefore, the expected results were achieved, and the HPLC-UV methodology can be applied as a practical tool during the pharmaceutical design of new drug products with acyclovir.

**Keywords:** Acyclovir, Chromatography, Spectrophotometry, Ultraviolet, Release, Validation.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HSV-1	Herpes simples tipo 1
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência no ultravioleta visível
SCB	Sistema de classificação biofarmacêutica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CACO-2	Adenocarcinoma de cólon humano 2
Kow	( <i>octanol/water</i> ) – octanol/água
pKa	Logaritmo negativo da constante de dissociação ácida
IFA	Insumo farmacêutico ativo
UV-Vis	Ultravioleta visível
VVZ	Vírus Varicela Zoster
CMV	Citomegalovírus
GTP	Guanosina trifosfato

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aciclovir .....	11
Figura 2 - Diagrama sistemático de Cromatografia líquida de alta eficiência. ....	21
Figura 3 - Guanosina Trifosfato (GTP) .....	23
Figura 4 - Molécula da Guanina.....	23

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Varreduras espectrais por espectrofotometria na região UV-Vis (190-500 nm) da solução padrão de aciclovir 18 µg/mL .....	34
Gráfico 2 - Varreduras espectrais por espectrofotometria na região UV-Vis (190-500 nm) do excipiente principal do placebo da formulação de liberação prolongada (Polissorbato 80). ...	34
Gráfico 3 - Curva analítica do aciclovir determinada por espectrofotometria. ....	35
Gráfico 4 - Análise dos resíduos da curva analítica do aciclovir determinada por espectrofotometria. ....	36
Gráfico 5 - Separação cromatográfica do aciclovir em coluna C8.....	37
Gráfico 6 - Separação cromatográfica da guanina em coluna fenil.....	37
Gráfico 7 - Curva analítica do aciclovir determinada por CLAE-UV.....	38
Gráfico 8 - Análise dos resíduos da curva analítica do aciclovir determinada por CLAE-UV. ....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diluição da curva analítica do aciclovir. ....	28
Tabela 2 - Diluição da curva analítica do aciclovir. ....	29
Tabela 3 - Diluição da curva analítica da guanina.....	31
Tabela 4 - Caracterização dos insumos farmacêuticos ativos de aciclovir.....	41
Tabela 5 - Análise do aciclovir na forma solúvel nas formulações testadas (n=2). ....	42

## SUMÁRIO

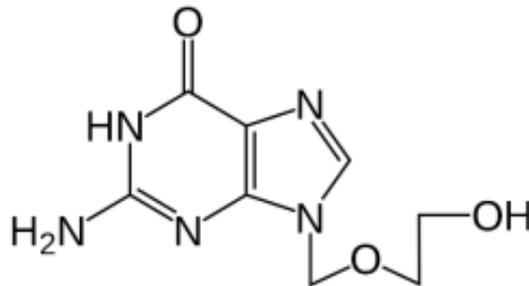
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1	ACICLOVIR .....	14
2.1.1	Propriedades físico-químicas .....	14
2.1.2	Farmacologia .....	16
2.1.3	Formas farmacêuticas do aciclovir .....	17
2.2	MÉTODO ANALÍTICO .....	18
2.2.1	Cromatografia .....	18
2.2.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	19
2.3	IMPUREZAS EM INSUMOS FARMACÊUTICOS .....	22
2.3.1	Guanina .....	22
2.3.2	Análise de impurezas em fármacos e medicamentos .....	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
4.1	MATERIAL .....	26
4.1.1	Padrões, matérias-primas farmacêuticas, reagentes e solventes .....	26
4.1.2	Equipamentos e acessórios .....	26
4.2	MÉTODOS .....	27
4.2.1	Determinação da umidade pelo método de Karl-Fisher .....	27
4.2.2	Análises por espectrofotometria na região do ultravioleta e visível .....	27
4.2.3	Preparo de soluções para análises espectrofotométricas e validação analítica .....	27
4.2.4	Análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta .....	28
4.2.5	Preparo de soluções para análises cromatográficas e validação analítica .....	29
4.2.6	Análise do teor de aciclovir e guanina nos insumos farmacêuticos ativos .....	31
4.2.7	Análise do teor de aciclovir nas formulações de liberação prolongada .....	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
5.1	ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA .....	33
5.2	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO ACICLOVIR .....	36
5.3	ANÁLISE DOS INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS DE ACICLOVIR .....	40

5.4	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS FORMULAÇÕES DE ACICLOVIR .....	41
6	CONCLUSÃO .....	43
	REFERÊNCIAS .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

O aciclovir (9-[2-hidroxietoximetil] guanina) (Figura 1), anteriormente denominado acicloguanosina, é um derivado sintético da guanina com uma cadeia lateral acíclica. É clinicamente administrado como agente antiviral e é bem tolerado por humanos. Apresenta atividade inibitória *in vitro* e *in vivo* contra os vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1), tipo 2 (HSV-2) e vírus varicela-zoster (VVZ). O aciclovir também é indicado para tratamento de meningite asséptica/encefalite herpética causada por HSV-1 e HSV-2. Atua interrompendo a replicação do DNA viral, possuindo alta afinidade pela enzima timina quinase (KEENEY; KIRK; BRIDGEN, 1982; SELBY *et al.*, 1979). Está disponível comercialmente em formas farmacêuticas injetáveis, como um pó liofilizado do sal aciclovir sódico para infusão de solução endovenosa, na dose 250 mg/10 mL. Também está disponível como comprimidos para liberação imediata de uso oral nas doses de 200 mg e 400 mg, suspensão de uso oral 25 mg/mL e cremes de uso tópico 50 mg/g (BRASIL, 2022).

Figura 1 - Aciclovir



(C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>; 225,21 g/mol, 2-Amino-1,9-di-hidro-9- [(2-hidroxietoxi)metil]-6H-purin-6-ona [59277-89-3])

Fonte: autoria própria

A absorção oral do aciclovir é baixa, com biodisponibilidade variando de 10 a 30% quando administrado na forma de comprimidos. Isto está relacionado ao próprio fármaco e não ao medicamento e sua liberação. A classificação do aciclovir como fármaco da Classe III (altamente solúvel e pouco permeável) foi sugerida de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) para as dosagens de comprimidos comercializadas no Brasil. Os dados de permeabilidade na linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2), assim como o valor coeficiente de partição (log K<sub>ow</sub> a 22 °C de -1,56) são indicativos da baixa permeabilidade do aciclovir, por se tratar de uma molécula hidrofílica. Este fator é a etapa limitante em seu processo de absorção por via oral, que ocorre extensamente pela rota paracelular. Para tratar encefalites virais, o aciclovir é administrado em altas doses por infusão

endovenosa na dosagem de 10 mg/kg de 8/8 horas pelo período de 14 a 21 dias (ARNAL ET AL., 2008; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2009).

O aciclovir se apresenta na forma de um pó branco ou quase branco, possui peso molecular 225,2 g/mol na forma de base livre e tem ponto de fusão em 255 °C, com decomposição térmica. Possui caráter de ácido e base fraca, com constante de dissociação ácida (pKa) de 2,27, referentes aos grupos amina terciária em sua estrutura química. A guanina é descrita como a principal impureza do aciclovir em insumos farmacêuticos ativos (IFAs) (LASKIN ET AL., 1982; PRASSE ET AL., 2010; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2011).

Métodos analíticos para análise qualitativa e quantitativa do aciclovir em medicamentos são importantes no desenvolvimento farmacotécnico e na rotina de produção industrial, destacando o uso das técnicas de espectrofotometria nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis) e a cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV). Os métodos analíticos por espectrofotometria UV-Vis são muito utilizados em laboratórios para quantificação do analito de interesse, baseando-se nas medidas de absorbância e transmitância de radiação eletromagnética nas regiões do UV-Vis. Esse método apresenta vantagens e desvantagens. Entre as vantagens estão a rapidez da análise, a facilidade de operação dos equipamentos espectrofotômetros e também a sua precisão. Já entre as desvantagens, cita-se a baixa seletividade, uma vez que diversas moléculas presentes na amostra podem apresentar absorbância no mesmo comprimento de onda selecionado para análise do analito, e a baixa sensibilidade, não permitindo a quantificação de pequenas concentrações de alguns analitos (HARRIS, 2010).

A CLAE-UV permite a separação de componentes de uma amostra em questão, baseada nas diferentes interações diferenciais da amostra entre uma coluna cromatográfica (fase estacionária) e um sistema solvente (fase móvel), bombeada sob alta pressão através da coluna. Cada componente da amostra interage de maneira diferente com esse material sorvente da fase estacionária, o que leva a diferentes tempos de retenção para cada componente, gerando então a separação conforme as substâncias são eluídas da coluna até o detector. Essa técnica apresenta vantagens e desvantagens. A principal vantagem da CLAE-UV é a alta seletividade, devido à separação cromatográfica, o que faz com que haja menor interferência nos resultados quando há presença de contaminantes, além de ser versátil, permitindo análise simultânea de substâncias diferentes com alta sensibilidade. Como desvantagem significativa, cita-se o alto custo do equipamento e dos materiais de consumo, tempo maior que a espectrofotometria para

realização das análises e preparo das amostras e necessidade de treinamento mais especializado para manusear o equipamento (HARRIS, 2010).

As formulações orais para liberação modificada do aciclovir, administradas por via oral têm potencial para aumentar a biodisponibilidade deste fármaco, isso porque essas formulações além de serem de característica lipídica o que faz com que elas sejam mais permeáveis no intestino, o fármaco é também liberado de forma mais lenta no organismo o que contribui para uma melhora da biodisponibilidade do fármaco. (ASSIS, MARIA SILVIA GURGEL *et al.*, 2021). Para o desenvolvimento destas formulações, a padronização de métodos analíticos torna-se uma etapa essencial do delineamento experimental. Por isso, este projeto tem como objetivo o desenvolvimento e validação de métodos analíticos por CLAE-UV e espectrofotometria no UV para análise do aciclovir, de modo a ser aplicado como uma ferramenta nas etapas de desenvolvimento farmacotécnico de novas formulações lipídicas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ACICLOVIR

#### 2.1.1 Propriedades físico-químicas

O aciclovir (9-[2-hidroxi-etoximetil] guanina), fármaco antiviral, é amplamente utilizado no tratamento de infecções causadas por vírus da família Herpesviridae, tal qual herpes simples (HSV) e também o varicela-zóster (VVZ). Suas propriedades físico-químicas são problemáticas principalmente para as formulações via oral devido a sua grande hidrofília, tornando-o pouco absorvido no trato gastrointestinal. Com relação às suas propriedades físicas, o aciclovir é um sólido branco, cristalino, com uma massa molar de 225,2 g/mol e um ponto de fusão de aproximadamente 256°C. Ele possui uma baixa solubilidade em água, que é de cerca de 1 mg/mL a 25°C, o que influencia diretamente em sua biodisponibilidade oral. Entretanto, apresenta uma alta solubilidade em soluções ácidas, tendo então uma alta solubilidade do estômago. Essa baixa solubilidade dificulta o desenvolvimento das formulações, porém no mercado há formulações como comprimidos e suspensões de uso oral (KEENEY; KIRK; BRIDGEN, 1982; SELBY *et al.*, 1979).

Além disso, o aciclovir tem um pKa de 9,2, o que o caracteriza como uma base fraca. Entretanto, o aciclovir por ser uma molécula anfótera, também tem um pKa de 2,6 o que dá as características de ácido fraco para a molécula. Isso significa que sua solubilidade é dependente do pH do meio, apresentando uma maior solubilidade em meios ácidos. Essa característica é relevante principalmente para a formulação de medicamentos orais, visto que o pH ácido do estômago irá favorecer a dissolução do fármaco (ASSIS, MARIA SILVIA GURGEL *et al.*, 2021).

Já em relação à estabilidade do fármaco, o aciclovir em formas farmacêuticas sólidas de uso oral é relativamente estável à temperatura ambiente, mas deve ser mantido em locais secos e longe da luz para evitar a degradação. A sua estabilidade também pode ser influenciada pela umidade e pelo pH do meio, fatores importantes a serem considerados em suas diferentes formulações, como via oral, tópica ou intravenosa (TZANAVARAS; THEMELIS, 2007).

O aciclovir possui boa capacidade de penetração nas células hospedeiras, o que o torna eficaz em tratamentos de patologias de origem viral. Isso é facilitado pela sua estrutura química, visto ser um derivado de uma base nitrogenada. Essa estrutura de derivado de base nitrogenada do fármaco é fundamental para sua interação com os componentes celulares, isso porque o aciclovir exibe uma elevada afinidade pelo DNA viral e uma afinidade reduzida pelo DNA humano, o que pode ser explicado pelo seu mecanismo de ação farmacológico específico (SILVA; COSTA; OLIVEIRA, 2023).

Embora seja pouco lipofílico, sua capacidade de atravessar membranas celulares e alcançar a área de infecção é facilitada por sua baixa massa molar. No entanto, a biodisponibilidade oral do fármaco é comprometida devido à sua baixa solubilidade em água apesar de ser altamente hidrofílico, entretanto, apresenta uma maior solubilidade em soluções ácidas, com isso, esse fator é evidenciado pelo valor negativo de coeficiente de partição ( $\log K_{ow}$  a 22 °C de -1,56) e também por seu mecanismo de absorção intestinal relacionado à rota paracelular. A solubilidade de uma substância é um fator crítico para sua absorção pelo trato gastrointestinal após a administração oral, porém, no caso do aciclovir, o principal fator limitante da absorção do fármaco é a sua baixa permeabilidade intestinal visto que a principal rota de absorção é a paracelular, entretanto, essa rota pode-se saturar (ASSIS, MARIA SILVIA GURGEL et al., 2021).

Quanto ao perfil de segurança, o aciclovir é considerado seguro, com poucos efeitos adversos quando administrado nas posologias corretas. Contudo, em pacientes com insuficiência renal, a dose do fármaco pode precisar ser ajustada devido à sua excreção renal predominante, o que aumenta o risco de toxicidade renal. Isto se relaciona à baixa solubilidade do aciclovir, que em altas doses, como em infusões intravenosas, pode precipitar nos rins, causando uma disfunção renal temporária (KEENEY; KIRK; BRIDGEN, 1982; SELBY *et al.*, 1979).

Por fim, as propriedades físico-químicas do aciclovir, como baixa solubilidade em água, solubilidade pH-dependente e estabilidade sob condições de armazenamento adequadas, impactam diretamente na escolha da formulação e na seleção da via de administração, visando otimizar a terapia antiviral e reduzir os efeitos adversos.

### 2.1.2 Farmacologia

O Aciclovir destaca-se no manejo das infecções provocadas pelo herpes simples (HSV), varicela-zóster (VZV) e citomegalovírus (CMV). O fármaco está disponível em várias apresentações farmacêuticas, adequando-se a diferentes vias de administração, o que torna seu uso versátil na prática clínica. As formas farmacêuticas mais comuns contendo aciclovir incluem comprimidos, suspensões orais, pomadas oftálmicas para uso tópico ocular, pomadas tópicas para lesões cutâneas, além de soluções para infusão intravenosa. As diversas apresentações e formas de administração do aciclovir permitem um tratamento eficaz e seguro, possibilitando a adaptação da terapia à gravidade e localização das infecções, contribuindo para melhores resultados clínicos. As soluções para infusão intravenosa são geralmente indicadas em casos de infecções graves ou disseminadas, como encefalite herpética ou infecções que envolvem múltiplos órgãos, particularmente em pacientes imunocomprometidos (KEENEY; KIRK; BRIDGEN, 1982; SELBY et al., 1979).

Em termos de farmacodinâmica, o mecanismo de ação do aciclovir está intimamente relacionado à sua capacidade de interferir na replicação do DNA viral, inibindo a síntese do material genético necessário para a multiplicação do vírus. O aciclovir é um análogo do nucleosídeo guanosina, que é um nucleosídeo derivado da base purina guanina. O mecanismo de ação do aciclovir envolve em uma sequência de etapas bioquímicas específicas (KEENEY; KIRK; BRIDGEN, 1982).

Por ser considerado um pró-fármaco, para estar em sua forma ativa, o fármaco precisa passar por etapas de bioativação. O primeiro passo é a fosforilação do aciclovir, que ocorre em duas etapas principais. Inicialmente, o aciclovir é fosforilado pela enzima viral timidina quinase, que tem uma afinidade significativamente maior pelo fármaco do que pelos nucleosídeos naturais. Essa timidina quinase é produzida exclusivamente por células infectadas pelo vírus, o que confere ao aciclovir uma alta seletividade para células virais e, portanto, é importante destacar que isto reduz seus efeitos em células humanas saudáveis. Após essa primeira fosforilação, o aciclovir se converte em monofosfato de aciclovir, que contém um único grupo fosfato na sua estrutura. Em seguida, o monofosfato de aciclovir é sucessivamente fosforilado por enzimas celulares chamadas quinases celulares, transformando-se em trifosfato de aciclovir, esta que é a forma ativa do fármaco. O trifosfato de aciclovir é estruturalmente

semelhante à guanosina trifosfato (GTP), um nucleotídeo natural necessário para a síntese do DNA viral (KEENEY; KIRK; BRIDGEN, 1982).

Devido à semelhança estrutural com o GTP, o trifosfato de aciclovir se incorpora no DNA viral durante a replicação, substituindo a guanosina natural. No entanto, devido à presença de uma estrutura incompleta em comparação com a guanosina, o trifosfato de aciclovir atua como um terminador de cadeia. Sua incorporação no DNA viral interrompe o alongamento da cadeia, impedindo a adição de outros nucleotídeos e, assim, bloqueando a replicação do DNA viral. Esse efeito impede a multiplicação do vírus, limitando a disseminação da infecção. Como consequência direta dessa inibição da replicação viral, a carga viral no organismo do paciente é reduzida, o que resulta em alívio dos sintomas clínicos da infecção, como dor e lesões. Esse efeito também acelera a cicatrização das lesões associadas a infecções herpéticas, seja cutânea ou mucosa (KEENEY; KIRK; BRIDGEN, 1982).

Em suma, o aciclovir exerce um efeito antiviral altamente específico e eficaz, que envolve a inibição da replicação de DNA viral nas células infectadas. Seu mecanismo de ação, baseado na fosforilação seletiva e subsequente incorporação do trifosfato de aciclovir no DNA viral, permite uma interrupção da replicação viral e contribui para a redução dos sintomas e da carga viral, tornando-o um fármaco essencial no tratamento das infecções causadas por herpes vírus. Essa seletividade e eficácia são os principais fatores que explicam a utilização generalizada do aciclovir em práticas clínicas, especialmente para o tratamento de infecções por HSV, VZV e CMV em pacientes com diferentes graus de comprometimento imunológico (JAMES; PRICHARD, 2016).

### **2.1.3 Formas farmacêuticas do aciclovir**

O desenvolvimento de medicamentos contendo aciclovir a ser administrado por vias não-invasivas apresenta algumas limitações, destacando-se a baixa biodisponibilidade oral do fármaco. Devido a isso, em determinados casos, é necessário administrar doses mais elevadas para atingir concentrações terapêuticas eficazes nos tecidos infectados. No entanto, esse aumento na dosagem pode aumentar a probabilidade de ocorrência de efeitos adversos, sendo necessário a administração por via intravenosa, exigindo o tratamento em ambiente hospitalar,

o que representa um risco maior para o paciente (ASSIS, MARIA SILVIA GURGEL *et al.*, 2021).

Atualmente, no Brasil, as apresentações do aciclovir aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) incluem comprimidos de liberação imediata nas doses de 200 mg e 400 mg, creme dermatológico 50 mg/g, pomada oftálmica 30 mg/g e solução injetável 250 mg.

Além do mais, o aciclovir está incluído na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) do Sistema Único de Saúde (SUS). As apresentações disponíveis no SUS incluem comprimidos de liberação imediata na dose de 200 mg, creme 50 mg/g e pó para solução injetável de 250 mg (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023). Essa inclusão reflete a relevância do aciclovir no tratamento de infecções virais, sendo amplamente utilizado na rede pública de saúde.

## 2.2 MÉTODO ANALÍTICO

### 2.2.1 Cromatografia

A cromatografia é uma técnica analítica amplamente utilizada na separação, identificação e quantificação de componentes, ou analitos, presentes como uma mistura em uma amostra. Esta técnica se baseia na interação diferencial do analito entre as fases estacionária e móvel, possibilitando a resolução destes analitos conforme suas propriedades físico-químicas, como polaridade, tamanho molecular e afinidade química. Assim sendo, ocorre a separação cromatográfica (OHLWEILER, 1982).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, a cromatografia é uma ferramenta essencial no controle de qualidade de medicamentos, insumos farmacêuticos ativos (IFAs) e excipientes. Suas aplicações abrangem desde a determinação da pureza até a detecção de impurezas, garantindo que os produtos farmacêuticos atendam aos padrões de segurança, eficácia e qualidade (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2024).

Dentre as principais modalidades cromatográficas descritas na Farmacopeia Brasileira para análise de fármacos e medicamentos destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência

(CLAE, em inglês HPLC, *high performance liquid chromatography*). Esta técnica é amplamente utilizada devido à alta precisão e sensibilidade. Sua fase estacionária é composta por partículas de um material sólido, geralmente sílicas quimicamente modificadas, finamente divididas e empacotadas em uma coluna, e a fase móvel, que é composta por um líquido, este que pode ser polar ou apolar, dependendo da amostra a ser analisada (BRASIL, 2024).

Outro tipo de cromatografia descrito na Farmacopeia Brasileira é a cromatografia gasosa. Essa técnica é muito utilizada em análises de amostras contendo componentes voláteis, visto que é utilizado um gás como fase móvel. É amplamente empregada em análises de solventes residuais e impurezas voláteis. Também se cita a cromatografia em camada delgada (CCD), por ser um método analítico mais simples e econômico. Esta técnica é bastante empregada para análises qualitativas, com finalidade de realizar uma triagem preliminar geralmente com finalidade de identificação de compostos. A CCD necessita de uma fase estacionária depositada em uma superfície plana, podendo ser vidro ou alumínio, onde a fase móvel irá se deslocar por capilaridade, com isso havendo a migração diferencial dos analitos da amostra (BRASIL, 2024).

Por fim, a cromatografia por exclusão de tamanho, baseia-se na separação de moléculas de acordo com seu tamanho. Esta técnica é bastante utilizada em estudos de proteínas e polímeros. A Farmacopeia Brasileira enfatiza a importância do rigor metodológico na execução dos ensaios cromatográficos, abrangendo aspectos como validação (BRASIL, 2024).

### **2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A CLAE é uma técnica analítica de separação amplamente empregada no controle de qualidade e na análise de substâncias químicas em mistura na amostra. Essa técnica destaca-se por sua elevada precisão e sensibilidade, sendo amplamente utilizada nos segmentos industriais farmacêutico, alimentício e químico (BRASIL, 2024).

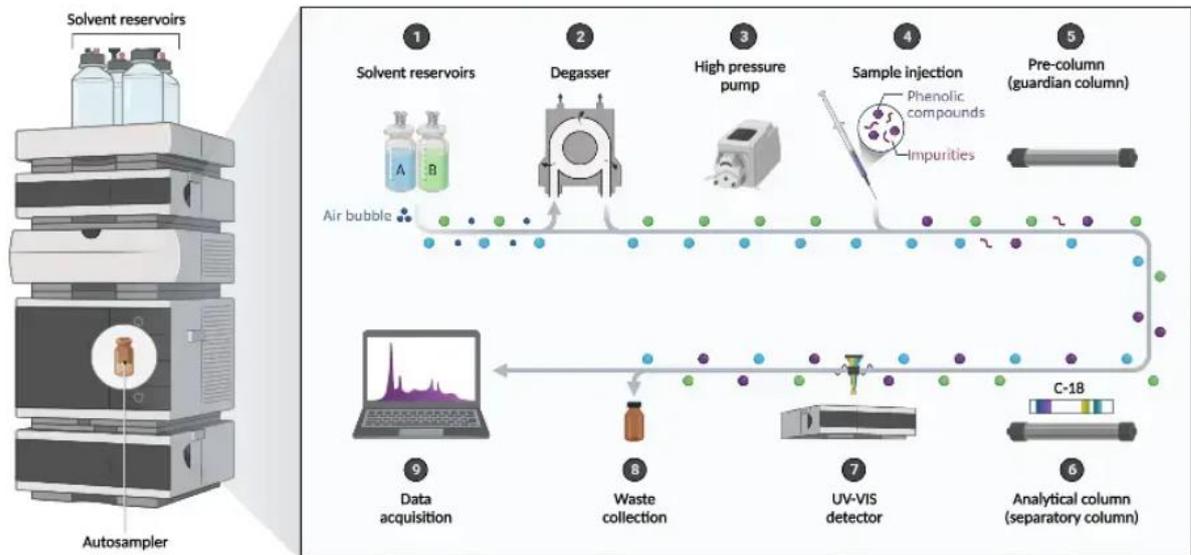
O fundamento da CLAE baseia-se na interação diferencial dos componentes de uma mistura com duas fases: a fase estacionária e a fase móvel. A fase estacionária é geralmente composta por partículas sólidas, finamente divididas, contidas em uma coluna cromatográfica selecionada de acordo com o experimento. Assim, a CLAE pode operar em diferentes modos,

fase reversa e fase normal. Na cromatografia em modo fase reversa, a fase estacionária é apolar, enquanto a fase móvel é polar, sendo amplamente utilizada para compostos orgânicos e substâncias de polaridade alta ou moderada. Por sua vez, a cromatografia em modo fase normal emprega uma fase estacionária polar e uma fase móvel apolar, sendo ideal para a separação de compostos apolares e misturas orgânicas (BRASIL, 2024).

A fase móvel usada em CLAE consiste em um líquido que atravessa a coluna sob pressão relativamente alta e mantida controlada, podendo apresentar características polares ou apolares. Geralmente consiste em uma mistura de água, soluções acidificadas ou tamponadas com modificadores orgânicos, como metanol e acetonitrila. A separação dos compostos ocorre em função das diferenças de afinidade dos analitos entre as fases estacionária e móvel, resultando na eluição em tempos diferentes, conhecidos como tempos de retenção (BRASIL, 2024).

O sistema CLAE (Figura 2) é composto por diversos módulos. O reservatório contém a fase móvel, que pode ser um solvente ou uma mistura de solventes, que deve ser previamente filtrada para remoção de partículas e desaerada por vácuo ou sonicação para remoção de gases. A fase estacionária, por sua vez, é geralmente uma coluna preenchida com partículas de sílica funcionalizadas com grupos químicos, sendo eles a sílica “nua”. Um exemplo comum é a coluna C18, constituída por cadeias de hidrocarbonetos octadecil, com 18 átomos de carbono, ou C8, octil, com 8 átomos de carbonos. Essa configuração confere à coluna uma alta afinidade por compostos apolares ou levemente polares, tornando-a essencial para a separação de componentes hidrofóbicos (BRASIL, 2024).

Figura 2 - Diagrama sistemático de Cromatografia líquida de alta eficiência.



Fonte: High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications, 2022.

A bomba é um módulo do sistema CLAE que controla o fluxo da fase móvel e garante a pressão necessária para a separação dos compostos. Para que a separação seja eficiente e reprodutível, o sistema opera sob altas pressões. O módulo do injetor, por sua vez, tem a função de introduzir pequenas quantidades de amostra na corrente da fase móvel, com volumes consistentes, geralmente em microlitros, assegurando a precisão e a reprodutibilidade das análises (BRASIL, 2024).

Por fim, o detector desempenha um papel essencial, identificando e quantificando os analitos separados pela coluna cromatográfica. Ele converte os sinais gerados pela interação dos analitos com a fase móvel em dados mensuráveis, que são apresentados como picos cromatográficos em um cromatograma. Logo, cada analito resolvido, ou separado, deve gerar um pico correspondente. Entre os detectores mais utilizados estão o detector de ultravioleta e visível (UV-Vis) e o detector de arranjo de diodos (DAD), escolhidos de acordo com as características específicas do experimento.

A Farmacopeia Brasileira enfatiza a relevância da CLAE no monitoramento da qualidade de insumos farmacêuticos ativos (IFAs), impurezas, produtos de degradação, além de poder ser aplicado na análise de produtos terminados, por exemplo, em análise do teor, uniformidade de conteúdo e dissolução. Assim, garante a qualidade e segurança dos IFAs e medicamentos comercializados. Ademais, os métodos de análise por CLAE devem ser validados quanto à precisão, exatidão, especificidade, linearidade e robustez, em conformidade

com as normas regulatórias vigentes, que no Brasil são definidas pela ANVISA (RDC 166/2017).

Portanto, a CLAE configura-se como uma técnica amplamente usada nas análises farmacêuticas, destacando-se por sua elevada eficiência e confiabilidade na obtenção de resultados precisos e reprodutíveis.

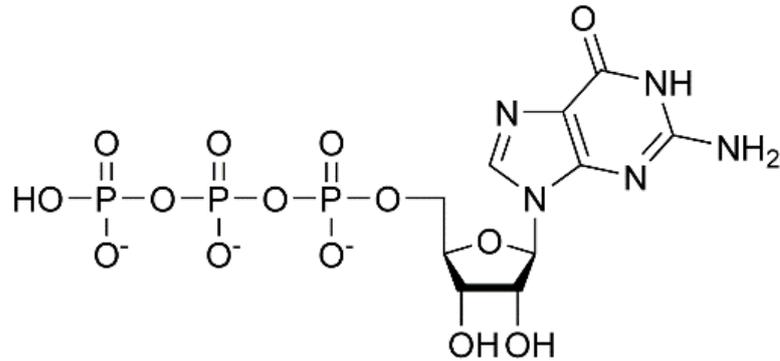
## 2.3 IMPUREZAS EM INSUMOS FARMACÊUTICOS

### 2.3.1 Guanina

A guanina é uma das quatro bases nitrogenadas presentes no DNA e RNA, desempenhando um papel fundamental na estrutura e função dos ácidos nucleicos. Quimicamente, a guanina é uma base púrica, ou purina, caracterizada por um anel duplo de carbono e nitrogênio. No DNA, ela forma um par de base com a citosina, por meio de três ligações de hidrogênio, garantindo estabilidade e complementariedade da dupla fita de DNA (WATSON; CRICK, 1953). Além de sua função estrutural, a guanina está também envolvida em processos biológicos essenciais, como a síntese de proteínas, a regulação gênica e sinalização celular (LODISH et al., 2016).

A guanina não está presente apenas no DNA e no RNA, mas também em outras moléculas biologicamente importantes, como o GTP (guanosina trifosfato) (Figura 3), que atua como fonte de energia em reações bioquímicas e como molécula sinalizadora em vias metabólicas (ALBERTS *et al.*, 2002). Além disso, a guanina é uma componente chave de coenzimas e nucleotídeos que participam de processos como a fosforilação oxidativa e a síntese de RNA (NELSON; COX, 2017).

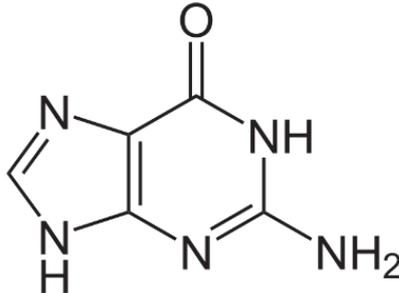
Figura 3 - Guanosina Trifosfato (GTP)



Fonte: Derivados de guanina, 2025.

A importância da guanina também se estende ao campo da medicina e da farmacologia. Análogos da guanina (Figura 4), como o aciclovir (Figura 1), são amplamente utilizados como antivirais, explorando a semelhança estrutural com a base nitrogenada para inibir a replicação viral (ELION, 1982). Estudos recentes também destacam o papel da guanina em mutações genéticas e reparo de DNA, bem como sua implicação em doenças como o câncer (SAN CAR, 2016).

Figura 4 - Molécula da Guanina



Fonte: Derivados de guanina, 2025.

A relação entre a guanina e o aciclovir é um exemplo clássico de como o conhecimento sobre a estrutura e a função das moléculas biológicas pode ser aplicado no desenvolvimento de fármacos antivirais. O aciclovir é um análogo da guanina, o que significa que sua estrutura molecular é semelhante à da guanina, mas com modificações que permite sua ação antiviral. Quando o aciclovir penetra na célula infectada por um vírus, ele é ativado por uma sequência de reações envolvendo enzimas virais, resultando finalmente na interrupção da replicação do vírus (ELION, 1982).

A relação entre a guanina e o aciclovir ilustra como o entendimento da biologia molecular pode ser aplicado no desenvolvimento de fármacos eficazes. O aciclovir, análogo estruturalmente à guanina, interfere na replicação do DNA viral, oferecendo um tratamento altamente específico para infecções por herpesvírus. No entanto, as características

biofarmacêuticas e outros fatores, incluindo a resistência ao fármaco, permanecem um desafio, destacando a necessidade de pesquisas contínuas para o desenvolvimento de novos agentes antivirais (ARNAL *et al.*, 2008; SHARGEL; YU, 2012).

### **2.3.2 Análise de impurezas em fármacos e medicamentos**

A validação de métodos analíticos é uma etapa crucial no desenvolvimento de fármacos e na garantia da qualidade de produtos farmacêuticos. Um dos aspectos centrais desse processo é a avaliação da seletividade do método analítico. A seletividade é a capacidade do método de medir o analito de interesse na presença de outros componentes, como impurezas, excipientes ou matrizes complexas (FDA, 2015). Nesse contexto, a guanina é analisada em IFAs e medicamentos contendo aciclovir, pois pode estar presente como impureza da síntese ou como um produto de degradação formado ao longo do tempo de armazenamento (TZANAVARAS; THEMELIS, 2007).

A separação da guanina do aciclovir deve ser considerada na validação de métodos analíticos, podendo distinguir entre o fármaco e compostos estruturalmente semelhantes, assegurando a seletividade e a confiabilidade do método. Além disso, o método analítico também pode ser aplicado em estudos de estabilidade e na análise de impurezas (ICH, 2005; BRASIL, 2017). A guanina pode surgir como produto de degradação em fármacos que contêm estruturas de purina ou pirimidina. Sob condições de estresse, como exposição a calor, luz ou pH extremos, esses fármacos podem se degradar, liberando guanina como um dos subprodutos. Dessa forma, a inclusão da guanina nos estudos de validação ajuda a garantir que o método seja capaz de detectar e quantificar simultaneamente tanto o fármaco intacto quanto seus produtos de degradação, atendendo às exigências regulatórias (SINGH *et al.*, 2010).

Em resumo, a seleção da guanina como impureza no processo de validação de métodos analíticos para análise do aciclovir é plenamente justificada por ser um indicador da qualidade, seja para o IFA ou produto terminado. Essa abordagem é essencial para assegurar a qualidade e a segurança dos produtos farmacêuticos, além de atender às exigências regulatórias. (RDC 166/2017).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e padronizar métodos analíticos para análise quantitativa do aciclovir para aplicação no desenvolvimento de novas formulações de liberação modificada.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver e validar métodos por espectrofotometria na região UV-Vis e por CLAE-UV para quantificação do aciclovir;
- b) Comparar os resultados das determinações usando as diferentes técnicas analíticas;
- c) Analisar o teor de guanina em IFAs aciclovir usando o método analítico por CLAE-UV;
- d) Analisar o teor de aciclovir nas formulações de liberação prolongada em etapa de desenvolvimento farmacotécnico, usando o método analítico por CLAE-UV.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAL**

#### **4.1.1 Padrões, matérias-primas farmacêuticas, reagentes e solventes**

Ácido acético; ácido (orto) fosfórico; ácido oleico; água ultrapura; trietanolamina (TEA); metanol grau HPLC; miristato de isopropila; quitosana de baixo peso molecular (Êxodo Científica); polissorbato 80 (Dinâmica); aciclovir substância química de referência (Sigma-Aldrich. Envase/lote: P500254. Teor: 94,9% tal qual. Umidade: 4,7% determinada por Karl Fisher. Guanina: 0,3%. Impurezas: 0,4%); aciclovir matérias-primas (Fabricante: Zhejiang Zhe, Origem: China, Lote: 071103 e Fabricante: Zhejiang Charioteer Pharm. Co. L., Origem: China, Lote: 216451800).

#### **4.1.2 Equipamentos e acessórios**

Banho ultrassom; balança analítica de precisão; centrífuga; espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-VIS) duplo-feixe modelo AJX-6100PC Micronal, usando cubetas de quartzo 1 cm com caminho óptico 10 mm e volume 3,5 mL); sistema CLAE-UV modelo Alliance marca Waters; Karl-Fisher; medidor de pH de bancada; micropipetadores automáticos de volume ajustável 100-1000 µL e 500 – 5000 µL.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Determinação da umidade pelo método de Karl-Fisher

A determinação da umidade nos IFAs foi realizada pelo método de Karl-Fisher, conforme a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2016), com especificação de teor de umidade presente no aciclovir deve ser menor que 6%.

### 4.2.2 Análises por espectrofotometria na região do ultravioleta e visível

As análises foram realizadas em condições padronizadas usando como solvente o metanol, comprimento de onda de máxima absorção (255nm) definido após varredura espectral de solução padrão de aciclovir. Definiu-se o intervalo de concentrações em que uma relação linear entre a absorbância e concentração das soluções fosse obtida e testou-se a interferência da absorção de potenciais excipientes usados no desenvolvimento das formulações de liberação prolongada.

#### 4.2.2.1 Preparo de soluções para análises espectrofotométricas e validação analítica

O diluente utilizado foi o metanol. A seleção do comprimento de onda para análise do aciclovir foi realizada após a realização de varredura espectral, na região do UV-VIS (190-500 nm), de modo a selecionar o comprimento de onda de máxima absorção do fármaco ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ). Para analisar a interferência dos excipientes da formulação de liberação prolongada, realizou-se a varredura espectral de solução preparada a partir do principal componente do placebo (sem aciclovir, somente com o excipiente polissorbato 80), avaliando seu espectro de absorção na região do UV-Vis (190-500 nm).

O preparo da solução padrão estoque de aciclovir foi realizado em triplicata. Pesou-se 10,00 mg de substância química de referência (SQR) de aciclovir em balança analítica de precisão com 5 casas decimais. Em seguida, o padrão foi transferido quantitativamente para

balão volumétrico de 25 mL e o volume foi ajustado com o diluente metanol. Obtiveram-se três soluções padrão estoque de concentração 400 µg/mL. Foram preparadas duas soluções de concentrações intermediárias, que foram posteriormente diluídas para construção de curva analítica e a determinação da linearidade. As curvas analíticas foram, portanto, construídas a partir de soluções padrão estoque independentes. A solução de concentração intermediária 1 foi preparada por diluição de 2,5 mL da solução padrão estoque para balão volumétrico de 10 mL, obtendo uma concentração de aciclovir de 100 µg/mL. A solução intermediária 2 foi preparada por diluição de 6,25 mL da solução padrão estoque para balão volumétrico de 10 mL, obtendo uma concentração de aciclovir de 250 µg/mL (Tabela 1).

Tabela 1 - Diluição da curva analítica do aciclovir.

Concentração (µg/ml)	Alíquota de solução padrão (ml)	Balão volumétrico (ml)	Concentração da solução padrão usada
1	0,25	25	100 µg/ml
3	0,75	25	100 µg/ml
6	0,6	25	250 µg/ml
9	0,9	25	250 µg/ml
12	1,2	25	250 µg/ml
15	1,5	25	250 µg/ml
18	1,8	25	250 µg/ml

Fonte: autoria própria

Após as diluições, a leitura da absorbância das soluções diluídas foi realizada a 255 nm, e os resultados foram usados para realização dos cálculos. Após os cálculos, determinou-se a curva analítica por meio da equação de reta ( $y = ax + b$ ) e também o coeficiente de correlação ( $r$ ). O valor de  $r$  deve ser maior que 0,990 para caracterizar a linearidade do método. Com esses dados obtidos, a análise dos resíduos foi avaliada pelo teste de Breusch-Pagan e a homocedasticidade do método foi caracterizada.

#### 4.2.3 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta

As condições cromatográficas para análise do aciclovir, incluindo a separação da guanina, foram testadas e, depois, uma condição foi selecionada para os ensaios de validação analítica. Foram testadas separações em modo fase reversa usando colunas cromatográficas da marca Waters, modelo XTerra, com dimensões de 250 mm x 4,6 mm; 5 µm de diâmetro das

partículas; com recheios diferentes: octilsilano (C8) e fenil. A fase móvel testada foi uma mistura de trietilamina (TEA) a 0,5% v/v com pH ajustado com ácido fosfórico para 3,0 e metanol. As proporções de solvente na fase móvel foram testadas conforme a separação cromatográfica do aciclovir e da guanina, assim como o volume de injeção (20 e 50 µL). A vazão de fase móvel foi de 1,0 mL/minuto, forno a 30 °C, tempo de corrida de 10 a 15 minutos e detecção UV a 254 nm. Todas soluções injetadas em sistema CLAE-UV foram previamente filtradas usando filtro de seringa de PVDF hidrofílico com porosidade de 0,45 µm.

#### 4.2.4 Preparo de soluções para análises cromatográficas e validação analítica

O diluente utilizado foi o fluido gástrico simulado sem enzimas (FGSSE), visto ser um meio que usado para ensaios de liberação *in vitro*, em projetos futuros do grupo de pesquisa. Para o preparo do FGSSE, utilizou-se 7,0 mL de ácido clorídrico 37% P.A. e 2,0 g de cloreto de sódio, sendo os reagentes diluídos em 1 L de água ultrapura (Milli Q). O pH do diluente foi ajustado para 1,2.

Para o preparo da solução aquosa da fase móvel, foi adicionado 5 mL da solução de TEA em 1 L de água ultrapura. Adicionou-se em seguida 1 mL de ácido fosfórico P.A, adicionando mais ácido fosfórico até obter um pH final de 3, determinado em medidor de pH calibrado. A solução aquosa da fase móvel foi filtrada à vácuo usando membrana PVDF hidrofílica com porosidade de 0,45 µm.

O preparo da solução padrão estoque de aciclovir foi realizado em triplicata. Pesou-se 10,00 mg de SQR de aciclovir em balança analítica de precisão com 5 casas decimais. Em seguida, a massa da SQR foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL e o volume ajustado do balão foi com o diluente, FGSSE. Obtiveram-se três soluções padrão estoque de aciclovir na concentração 200 µg/mL, que foram posteriormente diluídas para construção de curva analítica e determinação da linearidade. As curvas foram, portanto, construídas a partir de soluções padrão estoque independentes. Para isso, foram feitas as seguintes diluições, conforme Tabela 2, sendo que a diluição na concentração de aciclovir de 50 µg/mL foi utilizada como uma solução de concentração intermediária.

Tabela 2 - Diluição da curva analítica do aciclovir.

Concentração (µg/ml)	Alíquota de solução padrão (ml)	Balão volumétrico (ml)	Concentração da solução padrão usada
----------------------	---------------------------------	------------------------	--------------------------------------

0,5	0,25	25	50 µg/ml
1	0,5	25	50 µg/ml
10	0,5	10	200 µg/ml
20	1,0	10	200 µg/ml
30	1,5	10	200 µg/ml
40	2,0	10	200 µg/ml
50	2,5	10	200 µg/ml

Fonte: autoria própria

Após as diluições, as soluções foram injetadas no sistema CLAE-UV nas condições cromatográficas definidas após a etapa de testes. A partir dos cromatogramas, foi possível determinar a área dos picos, após integração usando *software* Empower, para realização dos cálculos. Após os cálculos, determinou-se a curva analítica por meio da equação de reta ( $y = ax + b$ ) e também o coeficiente de correlação ( $r$ ). O valor de  $r$  deve ser maior que 0,990 para caracterizar a linearidade do método. Com esses dados obtidos, a análise dos resíduos foi avaliada pelo teste de Breusch-Pagan e a homocedasticidade do método foi determinada.

Para **analisar a interferência dos excipientes**, injetou-se solução preparada a partir de formulação placebo (mistura de excipientes sem o fármaco: miristato de isopropila, quitosana, polissorbato 80, polietilenoglicol 400 e solução de ácido acético), avaliando o aparecimento de picos nos mesmos tempos de retenção do aciclovir ou da impureza guanina.

Para analisar a **precisão**, preparou-se solução a partir do IFA de aciclovir fora do prazo de validade, em sextuplicata. Para isso, foram pesados 20,00 mg do IFA de aciclovir em balança analítica de precisão, e as massas foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL. O volume foi ajustado com diluente, obtendo soluções a 200 µg/mL. A partir dessas soluções a 200 µg/mL, foram realizadas diluições de 1 mL para um balão de 10 mL, ajustando o volume com FGSSE, de modo a obter uma concentração final do fármaco igual a 20 µg/mL.

Para a determinação da **exatidão**, utilizaram-se soluções padrão, soluções amostra e placebo (somente uma mistura de excipientes). Utilizaram-se as soluções estoque de padrão e amostra (IFA fora do prazo de validade), ambas na concentração de 200 µg/mL, que foram previamente descritas. Uma formulação placebo foi preparada a partir da mistura de miristato de isopropila, polissorbato 80, polietilenoglicol 400 e solução de ácido acético. Para determinação da porcentagem de recuperação, preparam-se soluções em sextuplicata, na concentração teórica de 20 µg/mL, a partir da transferência de 0,5mL da solução estoque do IFA vencida, 0,5mL da solução de padrão estoque e 0,25g de formulação placebo para balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, completou-se o volume com diluente FGSSE.

Para a **determinação da principal impureza** presente no aciclovir, a guanina, foi preparada uma solução estoque concentrada de guanina, em triplicata. Para isso, pesou-se 10,00 mg de padrão de guanina que foi transferido para balão volumétrico de 100 mL, obtendo uma concentração final de 100 µg/mL (0,1 mg/mL). Em seguida, completou-se o volume com FGSSE. Em seguida, realizaram-se diluições conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Diluição da curva analítica da guanina.

Concentração (µg/mL)	Alíquota de solução padrão (mL)	Balão volumétrico (mL)	Concentração da solução padrão usada
0,2	0,1	50	100 µg/mL
0,4	0,1	25	
0,8	0,2	25	
2,4	0,6	25	
3,2	0,8	25	
4,0	1,0	25	

Fonte: autoria própria.

#### 4.2.5 Análise do teor de aciclovir e guanina nos insumos farmacêuticos ativos

Para analisar o teor dos IFAs de aciclovir dentro e fora do prazo de validade, prepararam-se soluções em triplicata. Para isso, foram pesados 20,00 mg do IFA de aciclovir em balança analítica de precisão, e as massas foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL. O volume foi ajustado com diluente, obtendo soluções a 200 µg/mL de aciclovir, que foram injetadas para análise do teor de guanina. Com base na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2016), o limite de guanina máximo tolerável no IFA de aciclovir é 0,7%. A partir dessas soluções a 200 µg/mL de aciclovir, foram realizadas diluições de 1 mL para um balão de 10 mL, ajustando o volume com FGSSE, de modo a obter uma concentração final de 20 µg/mL, para análise do teor de aciclovir. Com base na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2016), o teor de aciclovir é especificado na faixa de 98,0 a 101,0%, em relação à substância anidra.

#### **4.2.6 Análise do teor de aciclovir nas formulações de liberação prolongada**

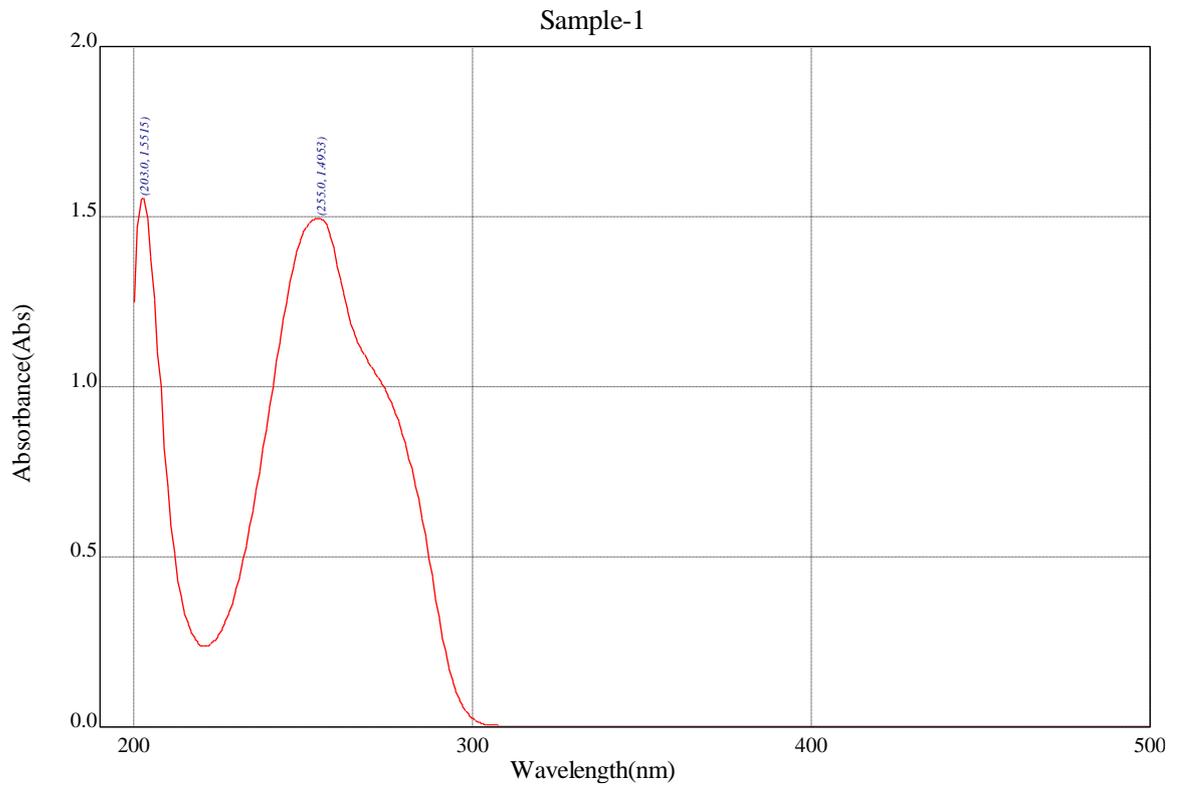
Uma quantidade de formulação líquida e viscosa (2,0 g), em desenvolvimento farmacotécnico, como potencial sistema de liberação prolongada, foi colocada em tubo de ensaio com tampa de 10 mL, adicionando-se na formulação um excesso de aciclovir (250 mg). Após 7 dias, os tubos com as formulações saturadas com aciclovir foram centrifugados (3500 a 60 minutos) e o sobrenadante com aspecto límpido foi coletado, considerando que a formulação no sobrenadante está saturada com o fármaco na sua forma solúvel. Foram testadas quatro formulações, codificadas como 1, 2, 3 e 4, variando somente a proporção dos excipientes previamente selecionados: miristato de isopropila, quitosana, polissorbato 80, polietilenoglicol 400 e solução de ácido acético. Pesaram-se quantitativamente, em duplicata, cerca de 250 mg do sobrenadante límpido de cada formulação saturada com aciclovir diretamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se cerca de 5 mL de FGSSE até completa dissolução da formulação e completou-se o volume com FGSSE. As soluções foram injetadas em sistema CLAE-UV e o teor de aciclovir foi calculado, sendo expresso como miligrama de aciclovir por grama de formulação (mg/g).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA

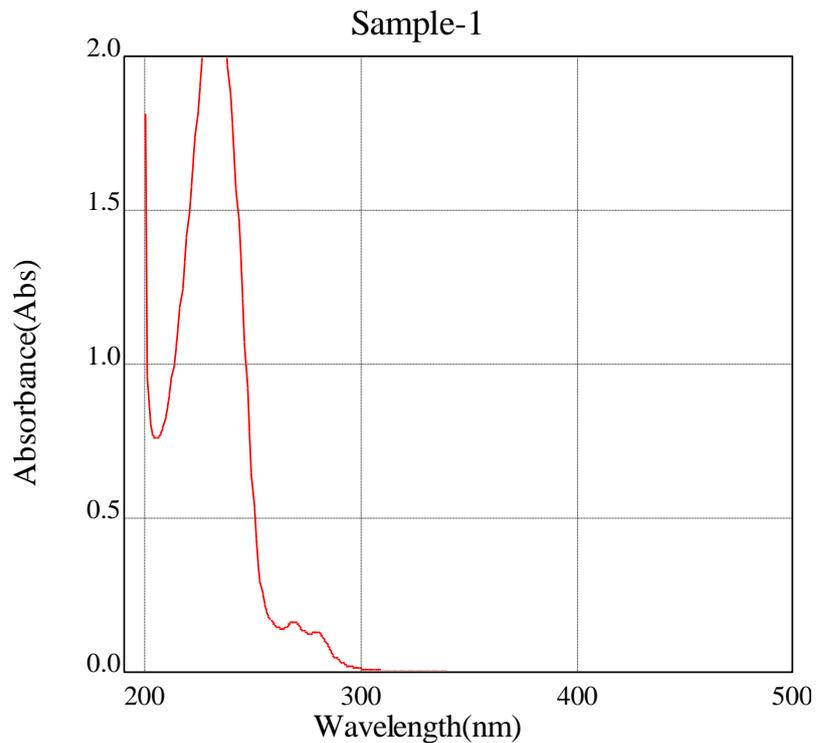
As varreduras espectrais no UV-Vis (200-500 nm) em metanol demonstraram que o aciclovir apresentou pico máximo de absorção em 255 nm, conforme Gráfico 1. O metanol foi selecionado ao considerar que meios aquosos foram avaliados em estudo anterior do grupo de pesquisa (Dados não apresentados), não alcançando seletividade, visto haver interferência de componentes da formulação de liberação prolongada (excipientes). Entretanto, os componentes da formulação apresentaram interferência no método, principalmente o polissorbato 80 (Gráfico 2). O polissorbato 80 foi considerado visto que em estudos do grupo de pesquisa é comumente considerado para desenvolvimento de formulações baseadas em microemulsões e cristais líquidos. Desta forma, a metodologia por espectrofotometria não pode ser aplicada para análise do fármaco em formulações de liberação prolongada, podendo ser considerada para a análise de IFAs de aciclovir. Entretanto, neste último caso, ainda é importante considerar que não se pode fazer diferenciação do aciclovir e da guanina por esta técnica analítica, visto que ambas moléculas (aciclovir e impureza guanina) absorvem no mesmo comprimento de onda (255 nm). Por este motivo, optou-se por analisar os IFAs usando método por CLAE-UV, conforme descrito a seguir.

Gráfico 1 - Varreduras espectrais por espectrofotometria na região UV-Vis (190-500 nm) da solução padrão de aciclovir 18 µg/mL



*Absorbance*: absorvância; *Sample*: amostra; *Wavelength*: comprimento de onda.  
Fonte: autoria própria

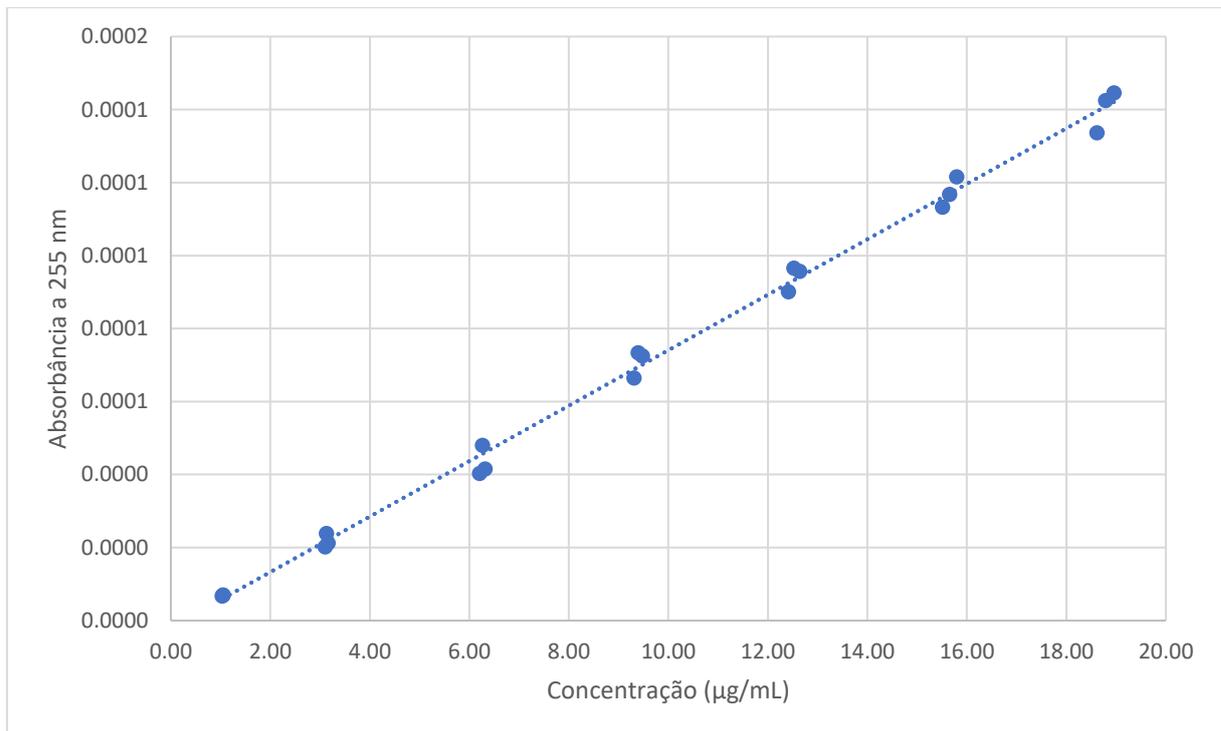
Gráfico 2 - Varreduras espectrais por espectrofotometria na região UV-Vis (190-500 nm) do excipiente principal do placebo da formulação de liberação prolongada (Polissorbato 80).



Fonte: autoria própria

A análise de soluções padrão de aciclovir foi realizada de modo a construir curva analítica (1 a 18  $\mu\text{g/mL}$ ), evidenciando a linearidade da metodologia (Gráfico 3). O coeficiente de correlação de Pearson,  $r = 0,99812$ , e coeficiente de determinação,  $r^2 = 0,99625$ , apresentaram resultados que demonstram a linearidade do método ( $r > 0,990$ ), conforme Figura 3. A equação de reta foi  $Y = 0,0760 (\pm 0,0002) x - 0,0189 (\pm 0,0026)$ . Realizou-se Anova, obtendo F de significação  $< 0,001$ , ou seja, o coeficiente angular foi diferente de zero, com p-valor  $< 0,001$  (significância 95%).

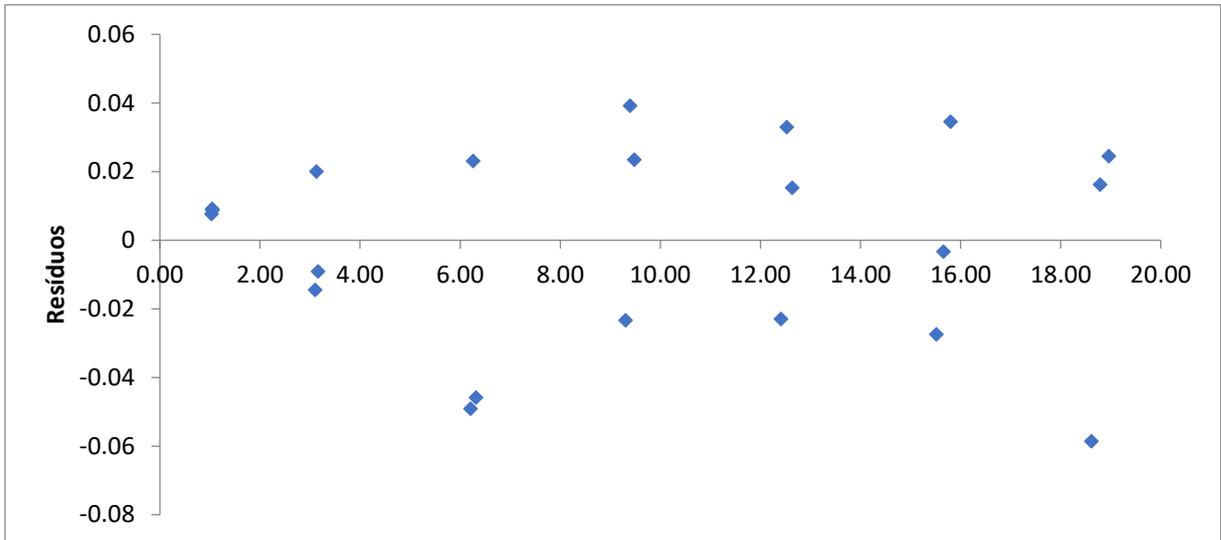
Gráfico 3 - Curva analítica do aciclovir determinada por espectrofotometria.



Fonte: autoria própria

Na análise dos resíduos (Gráfico 4), inferiu-se que os resíduos seguem uma distribuição normal, pois no teste de Breush-Pagan calculou-se F de significação = 0.2414 (rejeita hipótese nula de heterocedasticidade, uma vez que  $p > 0,05$ , indicando a homocedasticidade dos resultados). Para alcançar este resultado realiza-se análise de regressão linear a partir da plotagem no eixo x da variável x (absorbância) *versus* o quadrado dos resíduos no eixo y.

Gráfico 4 - Análise dos resíduos da curva analítica do aciclovir determinada por espectrofotometria.

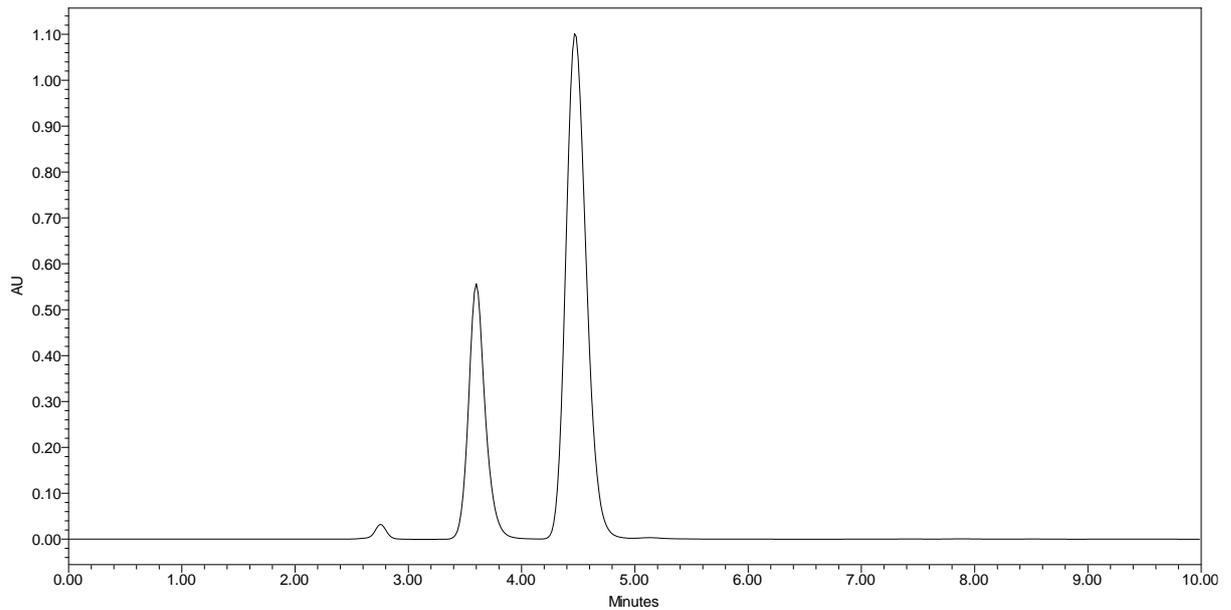


Fonte: autoria própria

## 5.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO ACICLOVIR

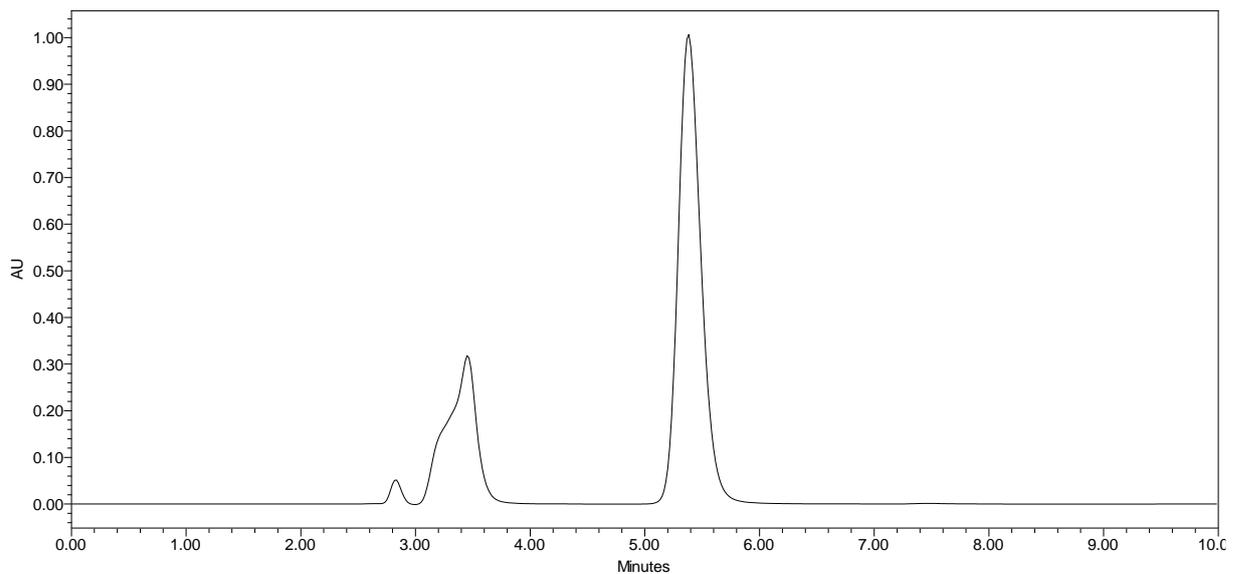
A separação cromatográfica do aciclovir e da sua impureza guanina, assim como os tempos de retenção destas duas substâncias, foram usados como parâmetros para desenvolvimento do método por CLAE-UV. Devido ao caráter hidrofílico das duas substâncias, a proporção do modificador orgânico foi muito pequena (5%), pois caso contrário, em maiores proporções de solvente orgânico, a eluição das substâncias seria muito rápida, próxima ao tempo morto, evidenciando baixa retenção na coluna cromatográfica, prejudicando a separação cromatográfica. A fase móvel foi selecionada usando as proporções de 95:5 v/v de solvente aquoso e metanol, obtendo melhores resultados ao usar a coluna C8 (Gráfico 5). Ao testar a coluna fenil (Gráfico 6), o pico da guanina não apresentou formato satisfatório, evidenciando um ombro, o que motivou usar a coluna C8. O comprimento de onda usado foi 254 nm.

Gráfico 5 - Separação cromatográfica do aciclovir em coluna C8.



Fonte: autoria própria

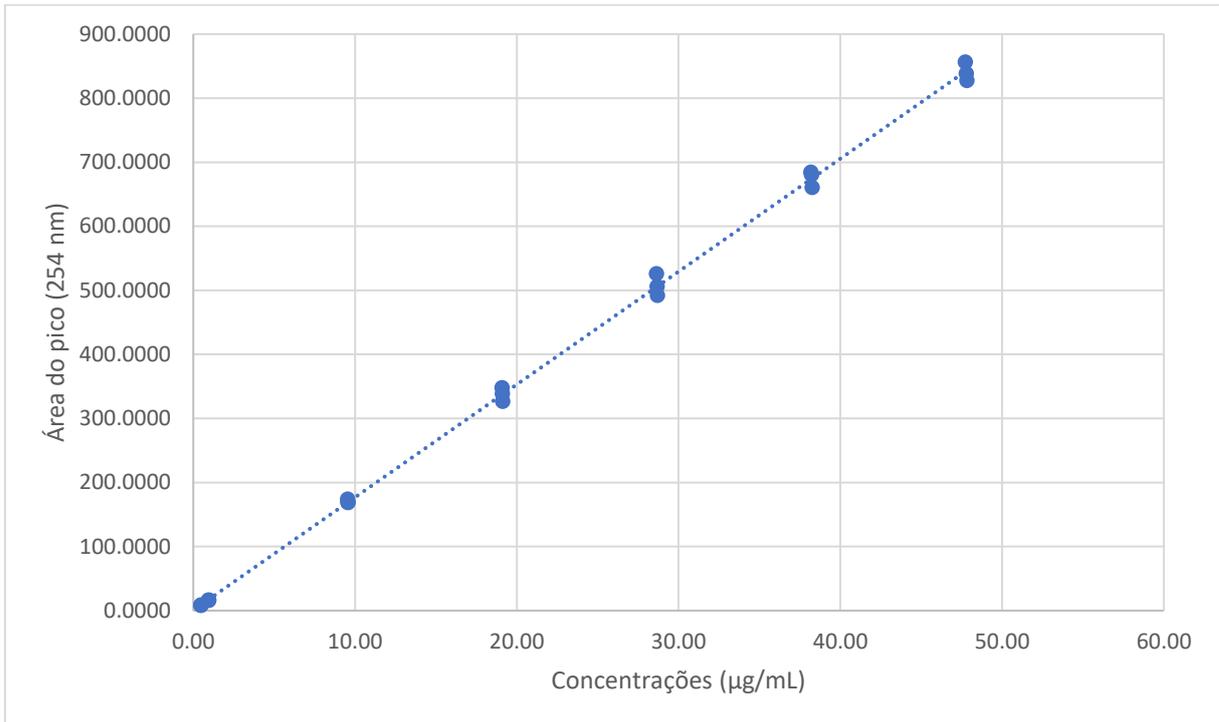
Gráfico 6 - Separação cromatográfica da guanina em coluna fenil.



Fonte: autoria própria

A análise de soluções padrão de aciclovir foi realizada de modo a construir curva analítica (0,5 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ), evidenciando a **linearidade** da metodologia (Gráfico 7). O coeficiente de correlação de Pearson,  $r = 0.99954$ , e coeficiente de determinação,  $r^2 = 0.99908$ , com resultados que demonstram a linearidade do método ( $r > 0,990$ ), conforme Gráfico 3. A equação de reta foi  $Y = 176198 (\pm 268) x - 7075 (\pm 7186)$ . Realizou-se Anova, obtendo F de significação  $< 0.001$ , ou seja, o coeficiente angular foi diferente de zero, com p-valor  $< 0.001$  (significância 95%).

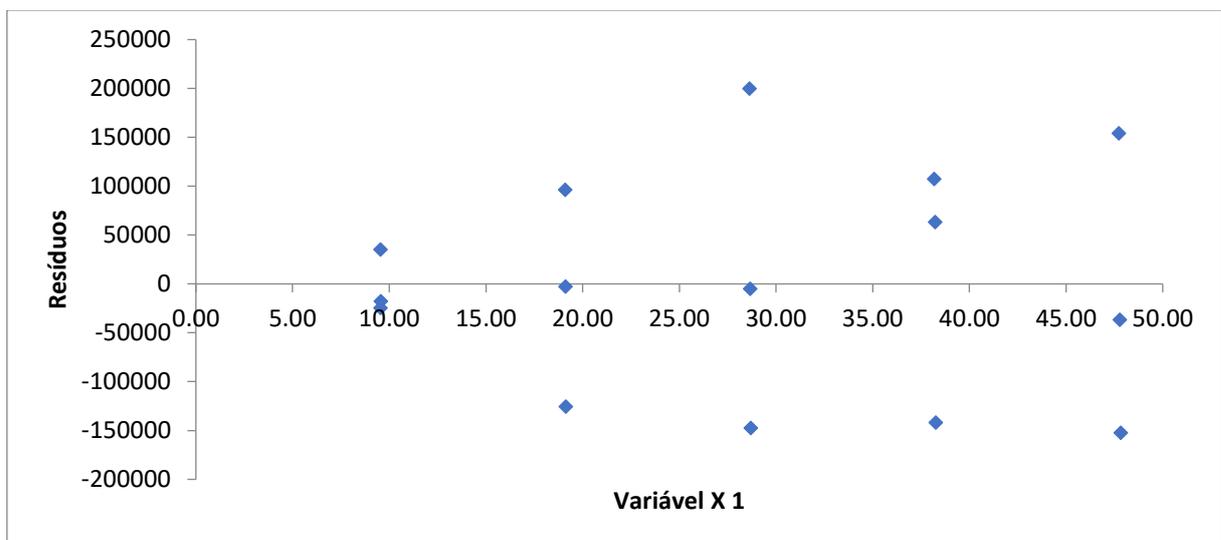
Gráfico 7 - Curva analítica do aciclovir determinada por CLAE-UV.



Fonte: autoria própria

Na **análise dos resíduos** (Gráfico 8), inferiu-se que os resíduos seguem uma distribuição normal na faixa de concentração de 10 a 50 µg/mL, pois no teste de Breush-Pagan calculou-se F de significação = 0.1267 (rejeita hipótese nula de heterocedasticidade, uma vez que  $p > 0.05$ , indicando a homocedasticidade dos resultados). Para alcançar este resultado realiza-se análise de regressão linear a partir da plotagem no eixo x da variável x (área do pico) *versus* o quadrado dos resíduos no eixo y.

Gráfico 8 - Análise dos resíduos da curva analítica do aciclovir determinada por CLAE-UV.



Fonte: autoria própria

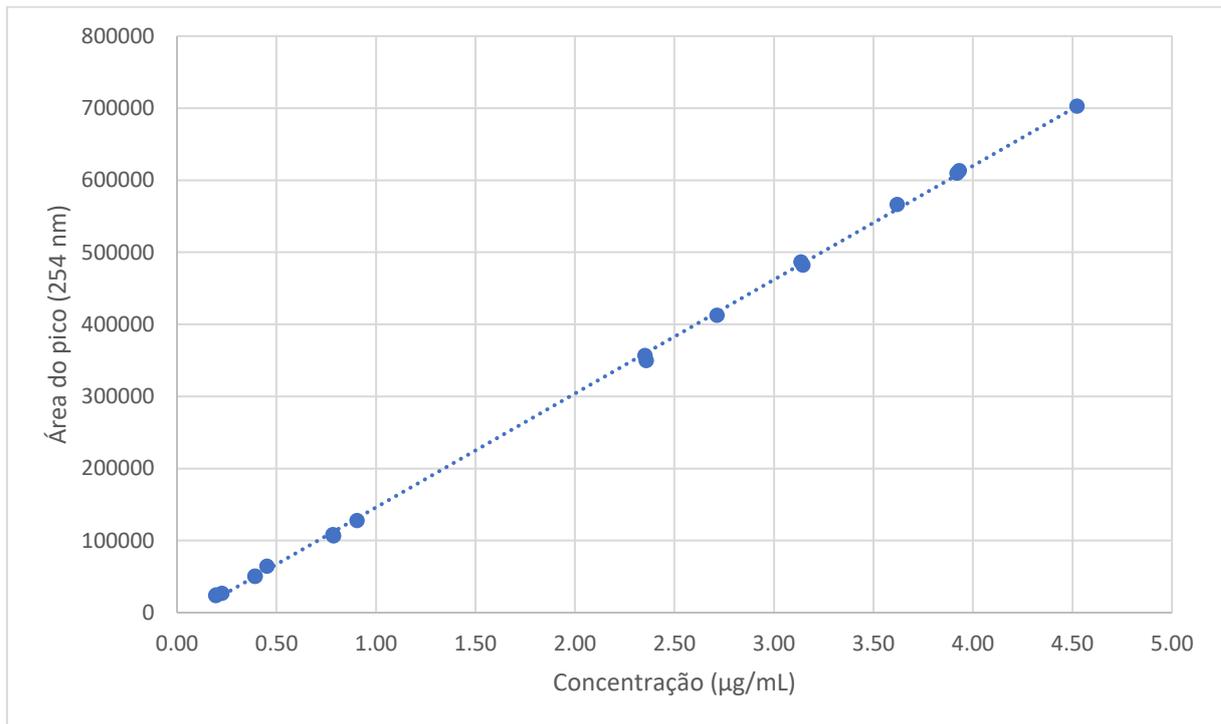
A **precisão intra-dia** foi avaliada pela dispersão do conjunto de valores determinados a partir das medições repetidas de uma amostra no mesmo dia. Quanto menor a dispersão dos valores, maior é a precisão. A precisão do método por CLAE-UV foi avaliada pela análise do IFA fora da validade e preparada em sextuplicata. O resultado indicou um desvio padrão relativo de 2,24 %., ou seja, inferior a 5,0%, de acordo com a RDC 166/1, indicando resultados satisfatórios, com baixa variabilidade.

A **exatidão** do método analítico foi avaliada determinando a concordância dos valores teóricos com aqueles determinados experimentalmente, por meio do cálculo da porcentagem de recuperação. A recuperação foi determinada em sextuplicada, alcançando um resultado de  $102,80 \pm 1,49\%$ . Os resultados de recuperação da amostra situaram entre 95% a 105%, o que diz que está dentro das especificações de acordo com a RDC 166/17, assegurando então que o método apresenta exatidão.

O **Limite de Quantificação (LQ)** e o **Limite de Detecção (LD)**, são parâmetros essenciais em métodos analíticos. São utilizados para avaliar a sensibilidade de um método além de quantificar um analito em uma amostra. O LD é a menor quantidade ou concentração de um analito que pode ser detectada por um método analítico. No experimento realizado para determinação do Aciclovir, o LD foi de 0,5 ug/mL. Já o LQ é a menor quantidade ou concentração de um analito em que pode ser quantificado com precisão e exatidão dentro das normas aceitáveis. O LQ determinado no experimento foi de 0,5ug/mL. (RDC 166/2017).

A análise de soluções padrão de guanina foi realizada de modo a construir curva analítica (0,2 a 4,0 µg/mL) para análise das impurezas nos IFAs, evidenciando a linearidade da metodologia (Gráfico 6). O coeficiente de correlação de Pearson,  $r = 0.99981$ , com resultados que demonstram a linearidade do método ( $r > 0,990$ ), conforme Gráfico 9. A equação de reta foi  $Y = 157966 x - 11930$ .

Gráfico - Curva analítica da impureza guanina determinada por CLAE-UV.



Fonte: autoria própria

### 5.3 ANÁLISE DOS INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS DE ACICLOVIR

Os insumos foram avaliados quanto ao teor de umidade (água), teor de aciclovir e da impureza guanina. Para a determinação da umidade das amostras de IFAs, utilizou-se o método de Karl-Fischer, na qual consiste em avaliar o teor de água presente na amostra (Tabela 4). Os resultados das duas amostras de IFAs indicaram resultados de acordo com o especificado na Farmacopeia Brasileira VI edição (2016). Na mesma tabela, estão os resultados da quantificação de guanina, alcançando valores especificados em conformidade com o especificado na Farmacopeia Brasileira VI edição (2016). Entretanto, o teor do aciclovir no IFA fora do prazo de validade apresentou-se resultado inferior a 98%, não estando em conformidade com o especificado. Porém, o IFA aciclovir dentro do prazo de validade, indicou resultados conforme a especificação da Farmacopeia Brasileira VI edição (2016). Este resultado evidencia que o aciclovir pode ter se degradado no IFA fora de validade e que a metodologia analítica desenvolvida tem sensibilidade suficiente para fazer esta caracterização.

Tabela 4 - Caracterização dos insumos farmacêuticos ativos de aciclovir.

Amostra	Doseamento do aciclovir (base anidra)	Água (umidade)	Guanina (impureza)
IFA fora da validade	95,7% ± 2,3%	5,0%	0,23 ± 0,01%
IFA dentro da validade	99,0% ± 1,0%	4,4%	0,09 ± 0,01%
Especificação	98% a 101% (substância anidra)	No máximo 6,0%	No máximo 0,7%

Fonte: autoria própria

#### 5.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS FORMULAÇÕES DE ACICLOVIR

A metodologia por CLAE-UV permitiu a análise do aciclovir presente na sua forma solúvel nas formulações, demonstrando que o método analítico permitiu quantificar o fármaco na presença dos demais excipientes. Os resultados estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5 - Análise do aciclovir na forma solúvel nas formulações testadas (n=2).

Formulação	Teor de aciclovir (mg/g)	Desvio padrão (mg/g)
1	1.77	0.01
2	1.81	0.03
3	1.69	0.04
4	1.62	0.03

Fonte: autoria própria

## 6 CONCLUSÃO

O método analítico por CLAE-UV apresentou-se **seletivo, linear, preciso e exato**, permitindo quantificar o insumo farmacêutico ativo e a sua impureza principal, a guanina, além de quantificar o aciclovir nas formulações de liberação prolongada, visto que pelo fato do fármaco possuir problemas na absorção oral, as formulações planejadas visam corrigir esses pontos desafiadores do Aciclovir. Entretanto, método por espectrofotometria-UV-vis não se apresentou adequado para as análises farmacêuticas pretendidas neste projeto devido à sua baixa seletividade, o que foi devido à interferência da guanina e do placebo da formulação. Assim, as análises por CLAE-UV quantificação do aciclovir usando FGSSE como diluente permitiram alcançar os objetivos e resultados esperados deste projeto.

## REFERÊNCIAS

ARNAL, J. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Aciclovir. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, n. 12, p. 5061–5073, 2008.

ASSIS, M. S. G. et al. Novel insights to enhance therapeutics with acyclovir in the management of herpes simplex encephalitis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 110, n. 4, p. 1557-1571, 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 2017.

Biomodel. Derivados de guanina. Disponível em: <[https://biomodel.uah.es/model1j/dna/estru/guanina\\_derivados.htm](https://biomodel.uah.es/model1j/dna/estru/guanina_derivados.htm)>. Acesso em: 14 fev. 2025.

ENGLUND, J. A.; FLETCHER, C. V.; BAKER, H. H. JR. Acyclovir therapy in neonates. *The Journal of Pediatrics*, v. 119, p. 129–135, 1991.

FDA. *Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics*. U.S. Food and Drug Administration, 2015.

HARRIS, D. C. *Quantitative chemical analysis*. 8. ed. New York, Ny: Freeman, 2010.

HARTLEY, L.; EVANS, J.; MACDERMOTT, N. E. Management and outcome in viral meningo-encephalitis. *Paediatrics and Child Health*, v. 21, n. 11, p. 488–494, 2011.

ICH. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

JAMES, S. H.; PRICHARD, M. N. Current and future therapies for herpes simplex virus infections: mechanism of action and drug resistance. *Current Opinion in Virology*, v. 18, p. 1-6, 2016.

KEENEY, R. E.; KIRK, L. E.; BRIDGEN, D. Acyclovir tolerance in humans. *The American Journal of Medicine*, v. 73, n. 1A, p. 176–181, 1982.

KENNEDY, P. G. E. Viral encephalitis. *Journal of Neurology*, v. 252, p. 268–272, 2005.

KIMBERLIN, D. W. et al. Safety and efficacy of high-dose intravenous acyclovir in the management of neonatal herpes simplex virus infections. *Pediatrics*, v. 108, n. 2, p. 230–238, 2001.

KING, D. H. History, pharmacokinetics, and pharmacology of acyclovir. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 18, n. 1, p. 176–179, 1988.

LASKIN, O. L. et al. Effects of probenecid on the pharmacokinetics and elimination of acyclovir in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 21, n. 5, p. 804–807, 1982.

LODISH, H. et al. *Molecular Cell Biology*. 8th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2016.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. *Drugs and Poisons. Clarke's analysis of drug and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. 4th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2017.

OHLWEILER, O. A. *Química Analítica Quantitativa*. 3. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1982.

PRASSE, C. et al. Antiviral drugs in wastewater and surface waters: A new pharmaceutical class of environmental relevance? *Environmental Science and Technology*, v. 44, n. 5, p. 1728–1735, 2010.

RAO, S. et al. Intravenous acyclovir and renal dysfunction in children: A matched case control study. *Journal of Pediatrics*, v. 166, n. 6, p. 1462-1468.e4, 2015.

SELBY, P. J. et al. Parenteral acyclovir therapy for herpesvirus infections in man. *The Lancet*, v. 79, p. 1267–1270, 1979.

SHARGEL, L.; YU, A. B. C. *Biofarmácia e Farmacocinética Aplicada*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

SINGH, S. et al. Pharmaceutical Impurities: A Review. *AAPS PharmSciTech*, v. 11, n. 3, p. 1461-1471, 2010.

TEAM, E. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) : Principle, Types, Instrumentation and Applications | LaboratoryInfo.com. Disponível em: <<https://laboratoryinfo.com/hplc/>>. Acesso em: 12 fev. 2025.

TZANAVARAS, P. D.; THEMELIS, D. G. High-throughput HPLC assay of acyclovir and its major impurity guanine using a monolithic column and a flow gradient approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 43, n. 4, p. 1526-1530, 2007.

VENKATESAN, A.; GEOCADIN, R. G. Diagnosis and management of acute encephalitis. *Neurology: Clinical Practice*, v. 4, n. 3, p. 206–215, 2014.