



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

ESCOLA DE FARMÁCIA

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO
ACICLOVIR EM ESTUDO DE MUCOADESÃO DE FORMULAÇÕES PELA
METODOLOGIA *IN VITRO* DE GOTEJAMENTO EM FLUXO**

NAIRA THAÍS RIBEIRO CAMPOS

OURO PRETO

2025

NAIRA THAÍS RIBEIRO CAMPOS

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO
ACICLOVIR EM ESTUDO DE MUCOADESÃO DE FORMULAÇÕES PELA
METODOLOGIA *IN VITRO* DE GOTEJAMENTO EM FLUXO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito parcial para obtenção do
título de bacharel em Farmácia da Universidade
Federal de Ouro Preto

Orientador: Prof. Dr. André Luís Morais Ruela

Ouro Preto

2025



FOLHA DE APROVAÇÃO

Naira Thais Ribeiro Campos

Validação de método analítico para aplicação na quantificação do aciclovir em estudo de mucoadesão pela metodologia *in vitro* de gotejamento em fluxo

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 14 de abril de 2025

Membros da banca

Doutor - André Luís Morais Ruela - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutora - Marina Guimarães Carvalho Machado - 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 25/08/2025



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luis Morais Ruela, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 25/08/2025, às 11:38, 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, informando o código verificador **0965916** e o código CRC **EB42D52A**.

AGRADECIMENTOS

Sempre que nos deparamos com momentos que nos conduzem a uma nova etapa da vida, nos lembramos que não atingimos nossas metas sozinhos. Meu caminho foi trilhado há 5 anos atrás, mas para que eu alcançasse meu objetivo, grandes pessoas estiveram ao meu lado. Agradeço a Deus por todas as bênçãos. Aos meus pais, Mario e Cecília, ao meu irmão Geovane e ao Shulim, por serem minha base, apoio, amor e incentivo mesmo em meio à incertezas. Às minhas tias Rosa e Horalda, e a toda minha família por compreenderem minhas ausências e por serem minha base em todos os momentos. Ao Iury, meu parceiro de alegrias e suporte em momentos de tristeza. Aos meus amigos Karla, Raelly e Leonardo, que mesmo de longe foram presentes.

Sou profundamente grata ao meu orientador, André, pela paciência, dedicação e orientações valiosas que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Ao apoio do Laboratório de Controle de Qualidade do PPG CiPharma, e à Fapemig. Agradeço também aos professores do curso, que contribuíram com conhecimento e inspiração ao longo da graduação.

Agradeço aos integrantes do PET Farmácia UFOP e a LAFITEC por todas as realizações que tivemos nessa jornada.

Por fim, expresso minha profunda gratidão à Escola de Farmácia de Ouro Preto, instituição que me acolheu com generosidade e se tornou cenário do meu amadurecimento pessoal e profissional. Sou imensamente grata a todos os professores que, com dedicação, excelência e entusiasmo, compartilharam seus conhecimentos e desempenharam papel essencial na minha formação como farmacêutica.

A cada pessoa que, de alguma forma, fez parte dessa jornada, direta ou indiretamente, deixo aqui meu mais sincero agradecimento. Sem o apoio, a sabedoria e o carinho de cada um de vocês, este momento não teria sido possível.

Muito obrigada!

RESUMO

O aciclovir é um fármaco antiviral, derivado da guanina, utilizado no tratamento do Herpes vírus. Sua absorção oral é limitada, com uma biodisponibilidade que pode variar entre 10% e 30% devido a suas características físico-químicas. De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), o aciclovir é classificado como um fármaco da Classe III, caracterizado por alta solubilidade e baixa permeabilidade. Quando é necessária uma terapia antiviral com doses elevadas de aciclovir, a administração intravenosa lenta se faz necessária, o que pode gerar incômodos ao paciente. Portanto, é relevante desenvolver formulações orais de liberação modificada do aciclovir e com propriedades mucoadesivas, com o objetivo de potencialmente aumentar a biodisponibilidade do fármaco. Para isso, os ensaios de liberação e mucoadesão *in vitro* são essenciais no desenvolvimento de formulações, sendo necessária a quantificação do fármaco para a triagem das formulações mais promissoras. Dessa forma, a validação de métodos analíticos aplicados a quantificação de fármacos no Brasil comumente é realizada conforme a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Assim, o objetivo deste trabalho é desenvolver e validar um método analítico baseado em cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV) para a análise do aciclovir nas etapas de desenvolvimento de formulações com propriedades mucoadesivas. Os resultados mostraram que o método analítico por CLAE-UV possibilitou a quantificação do aciclovir, e permitiu a separação da guanina (principal impureza), demonstrando seletividade, linearidade, precisão e exatidão e sensibilidade, em conformidade com a RDC 166/2017, incluindo complementações do trabalho proposto por Marson e colaboradores (2020). Dessa forma, os resultados esperados foram atingidos, e o método CLAE-UV pode ser utilizado como uma ferramenta prática para quantificação durante o desenvolvimento farmacotécnico de novos medicamentos contendo aciclovir.

Palavras-chave: Aciclovir, Cromatografia Líquida, Validação Analítica, Mucoadesão.

ABSTRACT

Acyclovir is an antiviral drug, derived from guanine, used in the treatment of Herpes virus infections. Its oral absorption is limited, with a bioavailability that can vary between 10% and 30% due to its physicochemical characteristics. According to the Biopharmaceutical Classification System (BCS), acyclovir is classified as a Class III drug, characterized by high solubility and low permeability. When high doses of acyclovir are required for antiviral therapy, slow intravenous administration becomes necessary, which can cause discomfort to the patient. Therefore, it is relevant to develop oral modified-release formulations of acyclovir with mucoadhesive properties, aiming to potentially increase the drug's bioavailability. For this purpose, in vitro release and mucoadhesion assays are essential in the formulation development process, requiring drug quantification to screen the most promising formulations. Thus, the validation of analytical methods applied to drug quantification in Brazil is commonly performed in accordance with Resolution RDC 166/2017 of the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA). In this context, the objective of this project is to develop and validate an analytical method based on high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) for the analysis of acyclovir during the development stages of formulations with mucoadhesive properties. The results showed that the HPLC-UV analytical method enabled the quantification of acyclovir and allowed the separation of guanine (the main impurity), demonstrating selectivity, linearity, precision, accuracy, and sensitivity, in compliance with RDC 166/2017 and additional recommendations proposed by Marson and collaborators (2020). Thus, the expected outcomes were achieved, and the HPLC-UV method can be used as a practical tool during the pharmaceutical development of new drug products containing acyclovir.

Keywords: Acyclovir, Liquid Chromatography, Analytical Validation, Mucoadhesion.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HSV-1	Herpes vírus simples tipo 1
HSV-2	Herpes vírus simples tipo 2
HHV-3	Vírus Varicela Zoster
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do ultravioleta visível
SNC	Sistema Nervoso Central
SCB	Sistema de classificação biofarmacêutica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
pppACV	Trifosfato de aciclovir
ACV	Aciclovir
dGTP	Trifosfato de desoxiguanosina
LoD	Limite de Detecção
LoQ	Limite de quantificação
MRC	Material de Referência Certificado
SQR	Substância Química de Referência
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
TGI	Trato Gastrointestinal
TA	Tampão acetato
OMS	Organização Mundial de Saúde
UV-Vis	Ultra violeta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS.....	2
2.1	Objetivo geral	2
2.2	Objetivos específicos	3
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3.1	Herpes.....	3
3.2	Epidemiologia.....	3
3.3	Transmissão	4
3.4	Sintomas	4
3.5	Aciclovir	5
3.6	Farmacocinética do aciclovir.....	7
3.7	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	8
3.8	Validação Analítica	9
3.8.1	Seletividade	9
3.8.2	Linearidade e precisão	10
3.8.3	Limite de detecção e quantificação	11
3.8.4	Exatidão	12
4	MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1	Material.....	13
4.1.1	Equipamentos e acessórios	13
4.2	Métodos	13
4.2.1	Validação da metodologia analítica para quantificação de aciclovir por CLAE-UV	13
5	RESULTADOS	16
6	DISCUSSÃO.....	19
7	CONCLUSÃO	20
	REFERÊNCIAS	20

1 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas virais representam um grave desafio à saúde global. Apesar dos esforços contínuos na busca por novos fármacos antivirais, os avanços têm sido modestos, uma vez que a maioria desses compostos apresenta aplicações restritas. Como resultado, poucos deles recebem aprovação das autoridades regulatórias para uso clínico (Barreiro, 2015).

Os herpesvírus são capazes de causar uma ampla variedade de doenças humanas. O vírus Herpes Simplex (HSV) faz parte da família *Herpesviridae* e é subdividido em dois sorotipos: HSV-1, associado ao herpes labial, e HSV-2, responsável pelo herpes genital. Entre suas características biológicas, destacam-se o rápido crescimento celular, a capacidade de infectar uma ampla variedade de hospedeiros e a habilidade, comum a todos os herpesvírus, de permanecer latente nas células dos hospedeiros por períodos indefinidos (Santos *et al.*, 2021).

O aciclovir, um análogo sintético da 2'desoxiguanosina, é atualmente o agente mais eficaz e seletivo contra os vírus do grupo Herpes. É considerado o tratamento de escolha para as infecções causadas pelo HSV devido à sua alta afinidade pelos vírus herpéticos e baixa citotoxicidade às células do hospedeiro. Esse fármaco é especialmente eficaz no tratamento do herpes labial e herpes genital (Golan, 2014; Rang, *et al.*, 2020).

No entanto, o aciclovir possui uma absorção limitada quando administrado por via oral, devido à sua baixa solubilidade em água, às características da sua estrutura molecular e à curta meia-vida biológica. Por isso, é necessário realizar administrações frequentes em altas doses para manter as concentrações plasmáticas do fármaco dentro dos níveis terapêuticos. Assim, há um interesse constante no desenvolvimento de uma formulação oral que aumente a biodisponibilidade do fármaco (Golan, 2014; Rang, *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2010).

A mucoadesão, ou bioadesão, é o processo pelo qual dois materiais, sendo pelo menos um deles de natureza biológica (como mucosa ou pele), permanecem unidos por determinado período de tempo. Esse fenômeno é influenciado por diversos mecanismos e, no caso da mucosa intestinal, está relacionado às interações não covalentes entre o muco (que contém mucina e água) e os componentes das formulações (como polímeros e formulações viscosas). O potencial desses sistemas está na capacidade de prolongar o tempo de permanência da formulação farmacêutica no local de ação ou absorção, aumentando o contato do fármaco com a mucosa.

Esse aumento no tempo de residência, aliado à liberação controlada, pode contribuir para a manutenção de concentrações terapêuticas no local de ação ou absorção, o que pode, por sua vez, melhorar a eficiência terapêutica e reduzir a necessidade de doses e frequências de administração. Esse efeito é particularmente relevante na administração oral de medicamentos, pois pode favorecer a absorção intestinal do fármaco (Chowdary; Rao, 2004; Carvalho *et al*, 2010; Carvalho, Chorilli; Gremião, 2014). Dessa forma, a pesquisa por formulações para administração de fármacos com propriedades mucoadesivas é muito importante, no sentido de melhorar a terapêutica, sobretudo, de fármacos de baixa permeabilidade intestinal.

Metodologias *in vitro* são importantes no delineamento de novas formulações, reduzindo o número de experimentos *in vivo*. A partir do uso destas metodologias, que mimetizam condições fisiológicas, é possível prever o comportamento do medicamento em processo de desenvolvimento no organismo. Com isso, é possível fazer uma triagem de um grande número de formulações a partir de ensaios *in vitro* de maior simplicidade e menor custo, e depois selecionar as formulações mais promissoras, obtendo maior chance de alcançar resultados inovadores nos ensaios pré-clínicos ou clínicos.

A caracterização da mucoadesão de uma formulação pode ser realizada pelo método de gotejamento em fluxo, usando intestino de suínos excisado, indicando quais sistemas podem promover um aumento do tempo de permanência das formulações em contato com a mucosa (Smart, 2005).

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia analítica que permita quantificar o aciclovir para futuras aplicações em estudos de liberação e mucoadesão *in vitro* na triagem de novas formulações orais contendo este fármaco.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Validar método analítico para quantificação do aciclovir por cromatografia líquido de alta eficiência (CLAE) em meio tampão acetato pH 4,5 em amostras coletadas em estudos *in vitro* para caracterização da mucoadesão das novas formulações.

2.2 Objetivos específicos

- a) Definir o intervalo/faixa de trabalho para o qual o método será validado;
- b) Atestar a linearidade do método por meio do preparo de curvas analíticas;
- c) Atestar seletividade, precisão, exatidão, LD e LQ por meio de ensaios preconizados na RDC 166/2017;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Herpes

Os vírus Herpes Simplex do tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) são neurotrópicos e causam lesões mucocutâneas, orofaciais e genitais, podendo ocasionar também infecção ocular e encefalite. Já o alfa-herpesvírus HHV-3 (herpesvírus de humanos 3 ou vírus da varicela-zóster) é o causador da varicela (ou catapora). No entanto, em adultos com algum tipo de imunossupressão, principalmente idosos, o HHV-3 sofre reativação e provoca o aparecimento do herpes-zoster, que pode causar complicações, principalmente, neuralgia pós-herpética. Além das diferentes patologias, os membros da família *Herpesviridae* causam infecções persistentes latentes por toda a vida dos hospedeiros e podem ser reativados (Santos *et al.*, 2021).

3.2 Epidemiologia

A prevalência de infecção pelo HSV-1 e HSV-2 é de 60% a 80% na população mundial, o que pode significar que há um vasto reservatório viral. Dito isso, a prevalência de infecção pelo HSV-1 é de 40% aos 15 anos de idade, e de 60 a 90% em adultos. Em países desenvolvidos, ela é de 20% aos 5 anos de idade, e de 40 a 60% entre 20 e 40 anos. Em populações não expostas a fatores de risco, como a imunossupressão, esta prevalência tende a se elevar linearmente com a idade, com picos durante a infância e a adolescência. Nos Estados Unidos, o vírus varicela-

zoster (HHV-3) é responsável por mais de 9.000 hospitalizações anualmente. Sua maior prevalência é na faixa etária de 4 a 10 anos (Geller *et al.*, 2012; Freer *et al.*, 2018).

A varicela tem uma taxa de infecção de 90%. Dados do Ministério da Saúde (2024) mostram que, no Brasil, no período entre 2014 a 2024, foram registradas 3.035 internações que evoluíram para óbito por varicela/herpes-zóster com ou sem outras complicações, com destaque na faixa etária da população dos maiores de 79 anos com 1.191 (39,2%). Em 2019 foi registrado o maior número de óbitos por varicela/herpes-zóster com 407 (13,4%), enquanto que nos anos de 2021 e 2024 foram registrados os menores números de óbitos com 261 (8,6%) e 154 (5,1%), respectivamente (Brasil, 2024).

3.3 Transmissão

A transmissão viral é dependente de um contato íntimo de um hospedeiro suscetível com alguém que esteja excretando ativamente os HSV-1, HSV-2 ou HHV-3, quer esteja manifestando os sintomas clínicos ou não. Os vírus penetram no organismo pelo contato direto com a pele apresentando alguma lesão, ou através das mucosas da boca ou genital. Os vírus podem ser transmitidos quando presentes em fluidos corporais como saliva, sêmen e secreções cervicais, ou no líquido das vesículas características da infecção, que são bolhas agrupadas em formatos similares a “cachos de uva”. O risco da infecção é maior quando ocorre o contato direto com o líquido das vesículas durante os episódios de herpes (Santos *et al.*, 2021).

3.4 Sintomas

As pessoas que ainda não possuem anticorpos preexistentes aos herpes vírus desenvolvem a infecção primária após o primeiro contato com os vírus. No HSV-1 e HSV-2, no geral, as manifestações mais prevalentes são a herpes orofacial e herpes genital, que geram vesículas dolorosas nas regiões afetadas. A interação do vírus com o hospedeiro é branda, levando ao estabelecimento da latência por toda a vida do hospedeiro. Normalmente, a infecção primária costuma ser mais invasiva que a recorrente, devido à falta de imunidade celular e humoral do hospedeiro, podendo ocorrer pneumonia, hepatite e/ou comprometimento do Sistema Nervoso Central (SNC). A infecção primária com HSV-1 ou HSV-2 dura de 2 a 3 semanas, mas a dor

pode persistir ainda por até 6 semanas. Durante o período de latência, pode ocorrer reativação causando lesões que podem se localizar no sítio da infecção primária inicial ou próximas a ele. O alfa-herpesvírus HHV-3 (herpesvírus de humanos 3 ou vírus da varicela-zóster) causa varicela ou catapora como infecção primária e os principais sintomas são erupções cutâneas com bolhas (vesículas) que coçam, febre leve e dor de cabeça, Já na reativação prevalece a herpes-zoster, que provoca sintomas como coceira e ardor locais, formigamento e dor nos nervos (Santos *et al.*, 2021).

3.5 Aciclovir

No Herpes vírus simples, a produção de desoxirribonucleosídios trifosfatos envolve a fosforilação de nucleosídios pela via de recuperação por uma timidinoquinase viral, em seguida, uma DNA polimerase viral acrescenta desoxirribonucleosídios trifosfatos ao genoma de DNA em crescimento. O estudo desse processo em duas etapas levou ao desenvolvimento de alguns dos agentes antivirais mais efetivos e seguros atualmente disponíveis, visto que as diferenças existentes entre as quinases e as polimerases humanas e virais permitem que os fármacos se beneficiem de duas etapas diferentes em uma única via (Golan, 2014; Rang, *et al.*, 2020).

Em 1979, o fármaco aciclovir (Figura 1) foi introduzido como antiviral para o tratamento de infecções produzidas pelos HSV-1, HSV-2 e HHV-3. Originalmente, o aciclovir foi sintetizado com o propósito de inibir a enzima adenosina desaminase, para melhorar o desempenho do fármaco vidarabina, e posteriormente foi verificado seu efeito antiviral. O fármaco é o primeiro dos análogos de nucleosídeos de segunda geração e um derivado do nucleosídeo guanosina (Golan, 2014; Santos *et al.*, 2021; Majewska, *et al.* 2022).

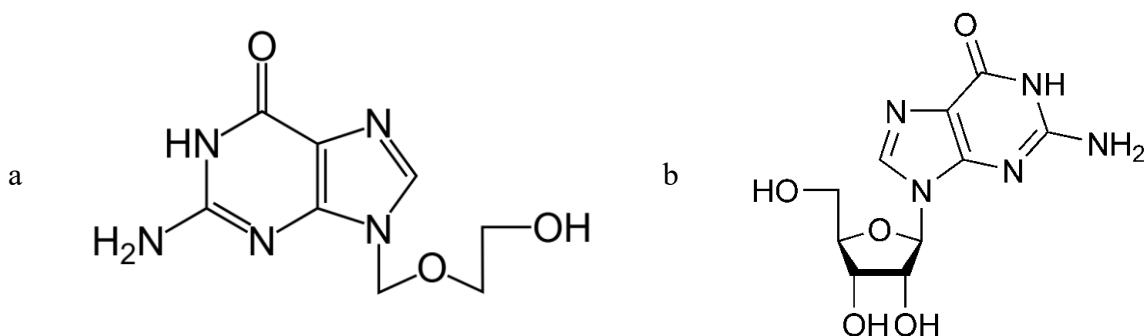
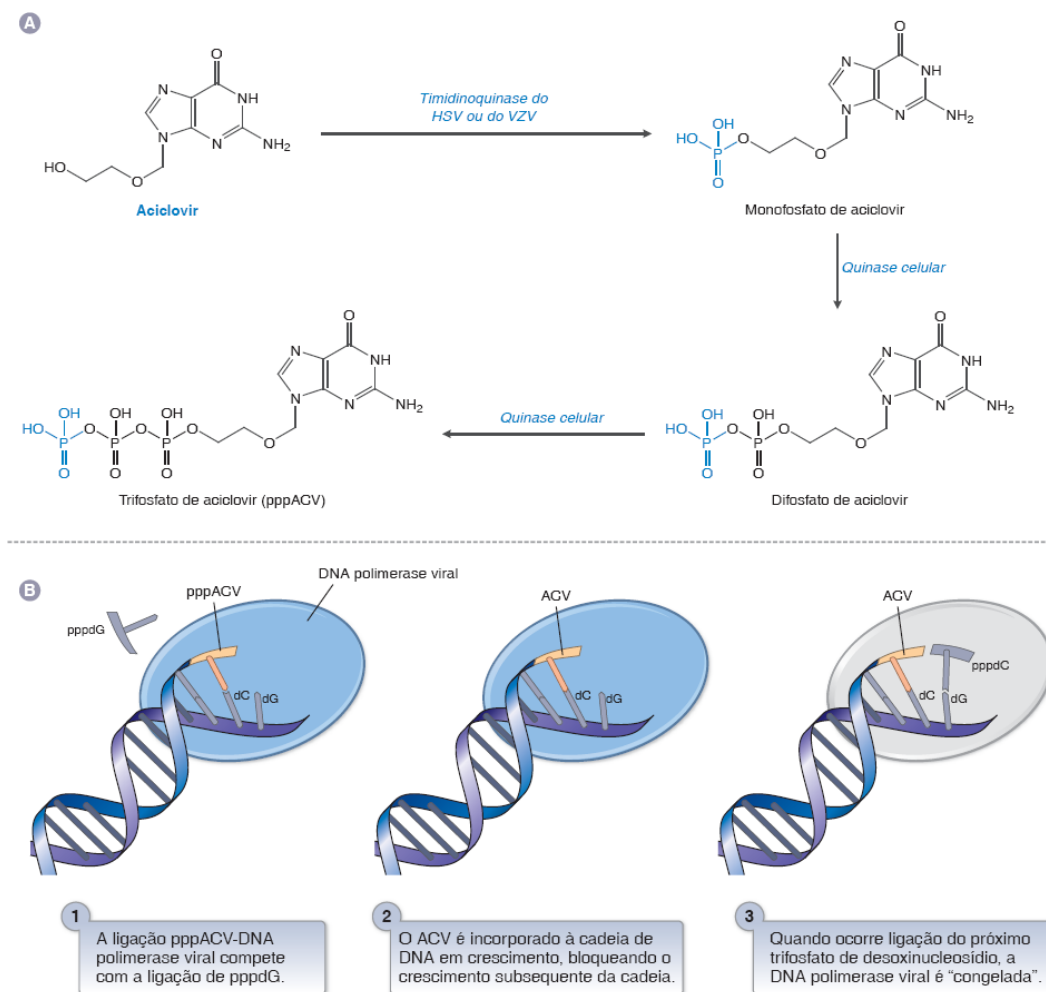


Figura 1. Estrutura química do aciclovir (a) e guanina (b)

Os análogos de nucleosídeos são inibidores altamente seletivos, direcionados à DNA polimerase viral, uma enzima codificada pelo próprio vírus. Seu efeito antiviral decorre da inibição da síntese de DNA viral, atuando por meio da incorporação competitiva do trifosfato de desoxiguanosina (dGTP) na cadeia de DNA viral (Santos, 2021).

Essa enzima viral possui uma capacidade muito maior de fosforilar o aciclovir (ACV) do que as enzimas presentes nas células hospedeiras. Por esse motivo, o aciclovir é ativado predominantemente nas células infectadas. As quinases da célula hospedeira convertem o monofosfato de aciclovir em sua forma ativa, o trifosfato de aciclovir (pppACV), que então inibe a DNA polimerase viral e bloqueia a extensão da cadeia de DNA. Esse composto é 30 vezes mais eficaz contra a enzima do herpesvírus do que contra as enzimas da célula hospedeira. O trifosfato de aciclovir, então, inibe com maior eficácia a DNA polimerase viral em comparação à DNA polimerase das células hospedeiras. (Figura 02). Por fim, o trifosfato de aciclovir é inativado dentro das células hospedeiras, possivelmente pelas fosfatases celulares (Golan, 2014).

Figura 2. Representação do mecanismo de ação do aciclovir



Fonte: Golan, 2014.

3.6 Farmacocinética do aciclovir

A administração oral de formas farmacêuticas sólidas, como comprimidos e cápsulas, contendo 200 a 800 mg de aciclovir, é indicada para a profilaxia e o tratamento de infecções por HSV-1, HSV-2 e HHV-3 em pacientes imunocompetentes. Nas doses de 200 mg e 400 mg, o aciclovir é classificado no grupo 3 do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), o que significa que possui alta solubilidade em meios aquosos, mas baixa permeabilidade nas membranas do trato gastrointestinal. Por outro lado, na dose de 800 mg (que não é comercializada no Brasil), o aciclovir se enquadra no grupo 4 do SCB, que é caracterizado por baixa solubilidade e permeabilidade. É predominantemente absorvido pela via paracelular e tem uma biodisponibilidade baixa e variável de 10–30%. Alguns estudos sugerem a existência

de um sistema carreador saturável ou uma janela de absorção limitada. A maior parte do fármaco é excretada pelos rins na forma inalterada, ou seja, como aciclovir (Kubbinga, *et al.*, 2015).

3.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE é uma técnica analítica de separação amplamente utilizada na análise de substâncias químicas presentes em misturas. Ela se destaca pela sua alta precisão e sensibilidade, sendo extremamente empregada no controle de qualidade de indústrias farmacêuticas (Araújo, 2021).

O princípio da técnica baseia-se na interação diferencial dos componentes de uma mistura com duas fases: a fase estacionária e a fase móvel. A fase estacionária é normalmente composta por partículas sólidas finamente divididas, inseridas em uma coluna cromatográfica, a qual é escolhida conforme os requisitos do experimento. A técnica pode ser realizada em diferentes modos, como a cromatografia em fase reversa e em fase normal. No modo fase reversa, a fase estacionária é apolar, enquanto a fase móvel é polar, sendo particularmente útil para compostos orgânicos e substâncias de polaridade alta ou moderada. Já na cromatografia em fase normal, utiliza-se uma fase estacionária polar e uma fase móvel apolar, ideal para a separação de compostos apolares e misturas orgânicas (Ribani, 2004; Araújo, 2021).

A fase móvel na CLAE é um líquido que percorre a coluna sob pressão controlada, podendo ser polar ou apolar. Geralmente, é uma mistura de água com soluções acidificadas ou tamponadas e modificadores orgânicos como metanol. A separação dos compostos ocorre com base nas diferenças de afinidade dos analitos entre a fase estacionária e a fase móvel, resultando em tempos de retenção distintos (Araújo, 2021).

Conforme as substâncias são liberadas, elas passam por um detector, um dos detectores mais comuns em cromatografia líquida de alta eficiência são os espectrofotométricos como o Ultra violeta visível (UV-Vis), utilizados para detectar substâncias que possuem grupamentos cromóforos. Esses detectores possuem uma célula de fluxo localizada após a coluna cromatográfica. Durante o funcionamento do sistema, a radiação ultravioleta passa continuamente pela célula de fluxo e é recebida pelo detector. À medida que as substâncias são eluídas da coluna e passam pela célula de fluxo, elas absorvem a radiação, provocando alterações mensuráveis no nível de energia (Araújo, 2021).

3.8 Validação Analítica

Os métodos analíticos são muitas vezes aplicados na indústria farmacêutica com objetivo de avaliar o cumprimento dos atributos de qualidade de produtos terminados. Entretanto, um nível de qualidade adequado só será atingido se o método analítico passar por um processo de validação consistente. Dessa forma, a validação analítica compreende uma ferramenta formal, sistemática e documentada que mede a capacidade de um método analítico de fornecer resultados confiáveis, precisos e reprodutíveis. No Brasil, a RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), norteia os critérios para a validação de métodos analíticos no país. Além disso, as principais agências reguladoras do mundo têm proposto várias diretrizes acerca da validação analítica, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e *Food and Drug Administration* (FDA) (Ribani, 2004; Marson, 2020).

No entanto, conforme o propósito analítico, diferentes parâmetros de validação podem ser necessários, como seletividade, efeitos de matriz, linearidade, precisão, exatidão, detecção, quantificação e robustez (Marson, 2020).

3.8.1 Seletividade

A seletividade, como parâmetro de validação analítica, conforme definido pela ANVISA (2017), refere-se à capacidade de um método analítico identificar ou quantificar de forma inequívoca o analito de interesse na presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e elementos da matriz. Por outro lado, o termo especificidade é entendido como a capacidade de um método em fornecer uma resposta exclusiva para o composto de interesse, mesmo na presença de outros compostos (Marson, 2020).

Todos os métodos analíticos devem ser capazes de determinar de forma inequívoca o analito de interesse, considerando o efeito da matriz e eventuais interferentes. Caso essa característica não seja garantida, diversos outros requisitos analíticos, como linearidade, exatidão e precisão, poderão ser gravemente comprometidos. Portanto, a seletividade deve ser considerada desde o início do desenvolvimento do método analítico, levando em conta tanto as

propriedades do analito quanto da matriz. É um parâmetro crucial, e recomenda-se que seja o primeiro a ser avaliado durante a validação analítica (Ribani, 2004).

A seletividade é geralmente avaliada por análise comparativa entre uma amostra contendo apenas o analito e uma amostra que inclui possíveis interferentes, os quais podem ser adicionados em quantidades relevantes considerando a aplicação do método analítico. Em métodos cromatográficos, espera-se que nenhum interferente seja eluído no mesmo tempo de retenção da substância de interesse. Ou seja, os cromatogramas contendo interferentes e matriz na ausência do analito não devem apresentar picos ou distorções na linha de base próximas ao tempo de retenção do(s) analito(s), e as interferências não devem interferir na quantificação deste analito, caso seja o propósito do método (Marson, 2020).

Uma forma de identificar a separação cromatográfica entre substâncias (como por exemplo, aciclovir e guanina) se dá pela análise da resolução entre os picos destes dois analitos. A resolução em picos cromatográficos é um parâmetro que quantifica a capacidade de uma coluna cromatográfica em separar dois picos de substâncias diferentes. Ela é importante pois indica se os picos de interesse estão suficientemente separados para que possam ser identificados e quantificados com confiabilidade. Uma resolução maior significa que os picos estão mais distantes, o que facilita a análise. Usualmente, valores maiores ou iguais a 1,5 assumem que houve uma boa resolução entre picos (Araújo, 2021).

3.8.2 Linearidade e precisão

A linearidade é definida como a capacidade de gerar resultados que sejam diretamente proporcionais às diferentes concentrações de um analito em um intervalo de concentrações conhecidas desta substância para estabelecer uma faixa linear específica. Normalmente, a linearidade é expressa por meio de regressão linear, calculada com base em uma relação matemática estabelecida pelos resultados instrumentais obtidos experimentalmente para o analito em diversas concentrações conhecidas, de acordo com a faixa de trabalho selecionada (Ribani, 2004).

O modelo linear analisa a relação entre duas variáveis, ajustando geralmente uma equação linear, que pode ser expressa pela Equação 1. Nessa equação, b representa o intercepto da reta de regressão e a a inclinação da reta.

$$(y = ax + b)$$

Equação 1 – Regressão linear simples

Os níveis de concentração utilizados para construir o teste de linearidade devem ser estabelecidos com base na faixa de concentração de interesse, garantindo precisão e exatidão adequadas. Algumas faixas lineares são geralmente padronizadas entre diferentes diretrizes, apresentando pequenas variações conforme os objetivos do método (Marson, 2020).

Além disso, a magnitude da resposta do instrumento pode variar consideravelmente de um dia para o outro devido a vários fatores, portanto, é recomendado que diferentes sequências de calibração sejam analisadas ao longo de pelo menos 2–3 dias diferentes, compostos por diferentes conjuntos de execuções analíticas. Além disso, analisar cada nível de calibração em réplicas é uma excelente maneira de minimizar o erro de calibração aleatório e aumentar a precisão dos valores previstos a partir das medições de amostras reais. A precisão é geralmente expressa como desvio padrão relativo entre diferentes réplicas de uma mesma concentração conhecida do analito. A precisão pode ser determinada dentro do mesmo dia (intradia) ou em dias diferentes (inter-dias) (Marson, 2020).

3.8.3 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LoD) consiste na menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada e identificada de forma confiável, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas do método analítico. O LoD pode ser estimado por três critérios diferentes: avaliação visual, relação sinal-ruído (S/N) e com base em parâmetros de curva analítica. Quando calculado com base em parâmetros de curva analítica, o LoD é calculado pela seguinte equação:

$$\text{LoD} = 3,3 \times \text{DP} / S$$

Equação 2 – Cálculo de limite de detecção

Onde DP é o desvio padrão dos interceptos da curva de calibração, ou o desvio padrão residual da curva, e S é a média da inclinação do gráfico de linearidade.

O método visual é empregado para analisar amostras com concentrações conhecidas e decrescentes do analito. Assim, o LoD está associado à menor concentração na qual o ruído e o sinal analítico torna-se distinguível (Marson, 2020).

Já, o limite de quantificação (LoQ) é definido como a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser medida quantitativamente com precisão e exatidão adequadas sob condições experimentais estabelecidas para o método analítico. A determinação do LoQ como parâmetro de validação analítica é recomendada para testes de quantificação de impurezas e quando as medições são realizadas em amostras com baixos níveis de analito (Marson, 2020).

3.8.4 Exatidão

A exatidão é o parâmetro responsável por avaliar a concordância entre o resultado encontrado pelo método analítico em avaliação e o valor aceito como verdadeiro ou como referência. O uso de um material de referência certificado (MRC) ou substância química de referência (SQR) pode ser usado para determinar a precisão comparando os valores medidos do método analítico (erros relativos e normalizados) com o valor de referência certificado. A porcentagem de recuperação determinada pela razão entre a média experimental e o valor certificado, incluindo os intervalos de confiança, também pode ser usada para expressar a exatidão. Dessa forma, o valor certificado é assumido como 100%, e o valor determinado corrigido pelas diluições é assumido como o valor experimental, isto é mostrado na Equação 3 (Ribani, 2004; Marson, 2020).

$$\%recuperação = \frac{\bar{x} \text{ valor experimental medido}}{\text{Material de Referência Certificado}} \times 100$$

Equação 3 – Recuperação

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Padrões, reagentes e solventes: Ácido acético; água ultrapura; acetato de sódio P.A.; hidróxido de sódio P.A.; metanol grau HPLC; quitosana de baixo peso molecular (Êxodo Científica); aciclovir substância química de referência (Sigma-Aldrich); aciclovir matéria-prima; propilenoglicol, polietilenoglicol 400, glicerina, veículos oleosos (miristato de isopropila, triglicerídeos de cadeia média e ácido oleico); monoleína (Myverol 18-92 K, Kerry), polissorbato 80 (Tween 80).

4.1.1 Equipamentos e acessórios

Agitador magnético; banho ultrassom; balanças analíticas de precisão; balança; centrífugas; sistema de filtração de fase móvel; bomba de vácuo; sistema de CLAE com detector ultravioleta (UV) ThermoFischer; bomba peristáltica de infusão; coluna para uso em sistema CLAE com recheio octadecilsilano C18 (250 x 4,6 mm); pré-colunas para uso em sistema CLAE; estufa de secagem; medidor de pH; micropipetadores automáticos; microscópio de luz polarizada; reômetro DV-III cone e placa da marca Brookfield; capela de exaustão; filtros de seringa PVDF; membrana de filtração de fase móvel PVDF; vials de vidro de 2 mL; vidrarias de uso geral (béqueres, balões volumétricos, provetas, bastões de vidro, entre outros).

4.2 Métodos

4.2.1 Validação da metodologia analítica para quantificação de aciclovir por CLAE-UV

4.2.1.1 Condições cromatográficas

A quantificação do aciclovir foi realizada pela técnica de CLAE-UV em condições padronizadas. Para isso, a fase móvel selecionada foi água acidificada com ácido acético 1% e metanol (95:5, v/v); o intervalo de concentrações de trabalho variou de 5 a 50 µg/mL; o diluente das amostras foi composto por uma solução tampão acetato em pH 4,5 (fluido simulado do TGI);

a detecção ultravioleta foi realizada a 252 nm. A coluna possui dimensões de 250 mm x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5 µm e recheio de octadecilsilano (C18); a temperatura do forno da coluna foi mantida a 30°C; e o volume de injeção de 20 µL.

4.2.1.2 Preparo das curvas

A metodologia analítica foi validada conforme os critérios da RDC N° 166 de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com complementações propostas pelo trabalho Marson e colaboradores (2020). O diluente utilizado foi o tampão acetato pH 4,5 (TA), como um fluido simulado do trato gastrointestinal, com relevância fisiológica considerando a aplicação da metodologia analítica em ensaios futuros para caracterização da mucoadesão das formulações (Brasil, 2019). Para preparar o TA, pesou-se e transferiu-se 5,98 g de acetato de sódio triidratado para um balão volumétrico com capacidade de 2000 mL. Adicionou-se 28 mL de ácido acético a 2,0 mol/L. Após, o volume do balão com capacidade de 2000 mL foi ajustado com água ultrapura e homogeneizado.

Para o preparo da solução aquosa da fase móvel, foi feita uma solução 95/5 de água ultrapura acidificada com ácido acético a 1% e metanol. A solução aquosa da fase móvel foi filtrada à vácuo usando membrana PVDF hidrofílica com porosidade de 0,45 µm.

Para analisar a interferência dos excipientes, injetou-se solução preparada a partir de placebo da formulação (mistura de lipídeos, água e demais aditivos), avaliando o aparecimento de picos nos mesmos tempos de retenção do aciclovir ou guanina. A guanina foi utilizada por ser uma impureza do aciclovir, com estrutura análoga. O preparo da solução padrão estoque foi realizado em triplicata. Pesou-se 10,00 mg de padrão de aciclovir em balança analítica de precisão com 5 casas decimais. Em seguida, o padrão foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL contendo 5 mL de metanol e o volume foi ajustado com água ultrapura. Obtiveram-se três soluções padrão estoque de concentração 1000 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 preparadas de forma independente. Para isso, preparou-se uma solução de concentração intermediária de 200 µg/mL usando TA como diluente. Para isso, pipetou-se 2 mL da solução estoque para balão de 10 mL e completou-se o volume com o diluente TA. A partir desta solução de concentração intermediária, foram feitas as seguintes diluições, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Diluições da curva analítica do aciclovir

Concentração (µg/mL)	Alíquota de solução padrão (mL)	Balão volumétrico (mL)
10	0,5	10
20	1,0	10
30	1,5	10
40	2,0	10
50	2,5	10

Fonte: Da autora.

Após as diluições, as soluções foram filtradas em filtro de seringa de 0,22 µm e injetadas no sistema CLAE-UV nas condições cromatográficas definidas. A partir dos cromatogramas, foi possível determinar a área dos picos, após integração usando *software* Thermo Scientific Standard Instrument Integration, para realização dos cálculos. Após os cálculos, determinou-se a equação de reta ($y = ax + b$) da curva analítica por regressão linear usando o método dos mínimos quadrados e também o coeficiente de correlação (r). O valor de r deve ser maior que 0,990 para caracterizar a linearidade do método.

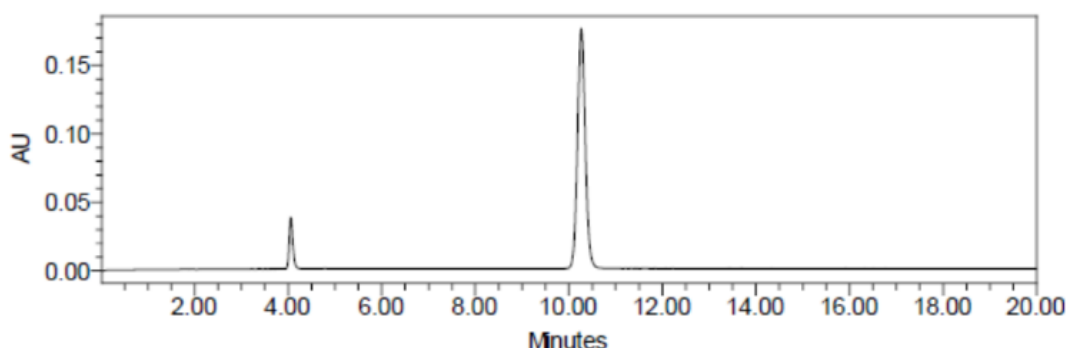
Para analisar a precisão intradia e inter-dias, analisaram-se soluções padrão de aciclovir, em triplicata, em três níveis de concentrações, sendo 10, 30 e 50 µg/mL, que foram preparadas do mesmo modo que no teste da linearidade. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR), e expressos em porcentagem da variação entre as réplicas.

A exatidão foi preparada do mesmo modo que a precisão, porém com contaminação das soluções padrão com placebo da formulação (mistura de excipientes). Os resultados deste teste foram expressos como porcentagem de recuperação (%) a partir do quociente da concentração experimental (numerador) pela concentração teórica (denominador), com o resultado multiplicado por 100 (Equação 2).

5 RESULTADOS

Na Figura 3 está apresentado o cromatograma na condição analítica em que a validação analítica foi realizada, demonstrando a separação do aciclovir da sua principal impureza (substância relacionada) guanina, o que foi adotado como critério indicativo de seletividade. Para demonstrar a seletividade dos métodos analíticos, os ensaios devem considerar substâncias estruturalmente semelhantes ao analito, sendo o critério de aceitação a separação cromatográfica destas substâncias estruturalmente análogas. A guanina é a principal impureza, e pode surgir como produto de degradação do aciclovir, que contém estruturas de purina (Tzanavaras, 2007).

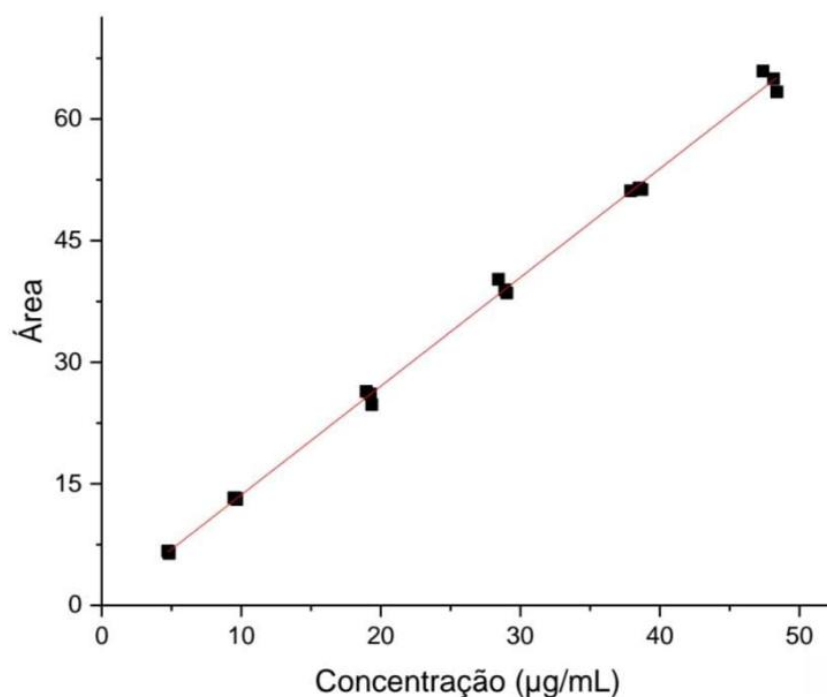
Figura 3. Cromatograma evidenciando a separação cromatográfica da guanina (tempo de retenção em torno de 4 minutos) e do aciclovir (tempo de retenção em torno de 10 minutos).



Fonte: Da autora.

Os resultados da linearidade estão apresentados na Figura 4. As curvas analíticas foram lineares no intervalo de 5 a 50 $\mu\text{g/mL}$, visto que, o coeficiente de correlação linear (r) foi maior que 0,99.

Figura 4. Linearidade do método analítico para quantificação do aciclovir por CLAE-UV (n=3).



Fonte: Da autora.

Obteve-se r igual a 0,9993, r^2 igual a 0,9986 e equação da reta média $y = 1,3438 (\pm 0,0307) x + 0,1525 (\pm 0,0773)$, evidenciando a linearidade do método analítico no intervalo proposto.

Os resultados de precisão intradia estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Precisão intradia (n=3)

Concentração média	Desvio padrão relativo (%)
4,78 µg/mL	2,32
29,08 µg/mL	2,25
48,06 µg/mL	2,00

Fonte: Da autora.

Para os resultados de precisão intradia e inter-dias, foi adotado como regra, o desvio padrão relativo das concentrações médias reais menor que 5%. Este limite seguiu o método proposto por Marson e colaboradores (2020) e apresentado nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 3. Precisão inter-dias (n=3)

Concentração média	Desvio padrão relativo (%)
4,94 µg/mL	2,49
29,66 µg/mL	1,12
49,43 µg/mL	1,94

Fonte: Da autora.

A metodologia cumpriu as especificações definidas para a exatidão, obtendo recuperações entre 95 e 105%, e com desvio padrão relativo menor que 5% entre as determinações (MARSON, 2020).

Tabela 4. Exatidão do método analítico

Concentração média	Recuperação (%)	Desvio padrão relativo (%)
4,98 µg/mL	96,83	1,77
29,87 µg/mL	101,22	2,10
49,78 µg/mL	99,68	1,43

Fonte: Da autora.

Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) foram determinados a partir das informações de inclinação e intercepto das curvas analíticas, que foram calculados a partir das seguintes equações (Brasil, 2017):

$$LQ = 10 \times \delta / IC$$

$$LD = 3,3 \times \delta / IC$$

Em que, IC é a inclinação e δ é o desvio padrão da interseção da curva de calibração, ambos determinados a partir das três curvas analíticas, preparadas utilizando soluções estoque (n = 3) de aciclovir independentes

Para caracterizar a sensibilidade deste método analítico, o limite de detecção foi calculado a partir dos parâmetros da curva analítica (desvio padrão da intercepção e valor da inclinação),

correspondendo à menor concentração de aciclovir que pode ser detectada, 0,19 µg/mL. Já o limite de quantificação é a menor concentração de aciclovir que pode ser quantificada de forma precisa, sendo calculado o valor de concentração de 0,58 µg/mL.

6 DISCUSSÃO

A metodologia por CLAE-UV permitiu a quantificação do aciclovir em fluido simulado com relevância fisiológica, demonstrando que o método analítico é capaz de quantificar o fármaco na presença dos demais excipientes das formulações a serem testadas. A análise dos resultados comprova que o método é seletivo, preciso, exato e sensível. Com isso, o método analítico por CLAE-UV pode ser utilizado como uma ferramenta em ensaios *in vitro* de novas formulações contendo aciclovir, de modo a caracterizar o seu potencial mucoadesivo.

Metodologias *in vitro* desempenham um papel crucial no desenvolvimento de novas formulações, pois ajudam a reduzir a necessidade de experimentos *in vivo*. Ao utilizar essas metodologias, que simulam condições fisiológicas, é possível prever o comportamento de medicamentos em desenvolvimento usando condições simuladas do organismo. Dessa forma, é possível realizar uma triagem de diversas formulações por meio de ensaios *in vitro* simples e de menor custo, selecionando os sistemas de liberação mais promissores para futuros ensaios pré-clínicos e clínicos (Carvalho, 2010).

A caracterização da mucoadesão por meio do método de gotejamento em fluxo pode ser realizada utilizando membrana biológica (intestino de suíno excisado). Para isso, a formulação mucoadesiva é aplicada sobre o tecido animal e o fluxo de fluido simulado com relevância fisiológica é continuamente gotejado em fluxo controlado (COOK, 2017). Diferentes formulações podem ser analisadas usando a metodologia *in vitro* para triagem das formulações com maior tempo de permanência no trato gastrointestinal (TGI), o que se correlaciona com aumento da biodisponibilidade oral do fármaco em estudo. Considerando a baixa permeabilidade de substâncias hidrofílicas, acredita-se que essas formulações possam promover aumento da sua absorção intestinal, logo, aumentando sua biodisponibilidade oral. Esses resultados são de grande relevância, pois podem apoiar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para fármacos com baixa biodisponibilidade oral, otimizando esquemas terapêuticos.

7 CONCLUSÃO

O método analítico usando CLAE-UV validado neste estudo mostrou-se adequado para quantificação do aciclovir em estudos de mucoadesão *in vitro*. Estes resultados são importantes para garantir a confiança na quantificação do aciclovir em formulações com potencial efeito mucoadesivo.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, Hiram; IRIS, Ademário. *Análise instrumental: uma abordagem prática*. Rio de Janeiro: LTC, 2021.

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.

BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos A. M. *Química medicinal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da catapora (varicela). Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/catapora-varicela/situacao-epidemiologica>. Acesso em: 12 jan. 2025.

CARVALHO, Flávia Chiva *et al.* Mucoadhesive drug delivery systems. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 46, n. 1, p. 1-17, 2010.

CARVALHO, Flávia Chiva; CHORILLI, Marlus; GREMIÃO, Maria Palmira Daflon. Plataformas bio (muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos-propriedades, metodologias e aplicações. *Polímeros*, v. 24, n. 2, p. 203-213, 2014.

CHOWDARY, Kora Pattabhi Rama; RAO, Yarraguntla Srinivasa. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 27, n. 11, p. 1717-1724, 2004.

COOK, Sarah L. *et al.* Mucoadhesion: A food perspective. *Food Hydrocolloids*, [S.l.], 2017.

CURRAN, D. *et al.* Meta-regression of herpes zoster incidence worldwide. *Infectious Diseases and Therapy*, v. 11, p. 389-403, 2022.

FORMARIZ, Thalita Pedroni *et al.* Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

FREER, G.; PISTELLO, M. Varicella-zoster virus infection: natural history, clinical manifestations, immunity and current and future vaccination strategies. *New Microbiologica*, v. 41, n. 2, p. 95-105, abr. 2018.

GELLER, Mauro *et al.* Herpes simples: atualização clínica, epidemiológica e terapêutica. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, v. 24, n. 4, p. 260-266, 2012.

GOLAN, David E. *Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

KUBBINGA, M. *et al.* The influence of chitosan on the oral bioavailability of acyclovir—a comparative bioavailability study in humans. *Pharmaceutical Research*, v. 32, p. 2241–2249, 2015.

MAJEWSKA, A.; MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. 40 years after the registration of acyclovir: do we need new anti-herpetic drugs? *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 7, p. 3431, 2022.

MARSON, Breno M. *et al.* Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: an overview focused on HPLC methods. *Química Nova*, v. 43, p. 1190-1203, 2020.

MATARAZZO, Ananda Pulini *et al.* Mucoadhesive nanostructured lipid carriers as a cannabidiol nasal delivery system for the treatment of neuropathic pain. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 159, p. 105698, 2021.

RIBANI, Marcelo *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RITTER, James M. *Rang & Dale farmacologia*. 9. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2020.

RUELA, André Luís Morais; CARVALHO, Flávia Chiva; PEREIRA, Gislaine Ribeiro. Exploring the phase behavior of monoolein/oleic acid/water systems for enhanced donezepil administration for Alzheimer disease treatment. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 105, n. 1, p. 71-77, 2016.

SANTOS, Norma Suely de O. *et al. Virologia humana*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

SMART, John D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1556-1568, 2005.

TZANAVARAS, Paraskevas D.; THEMELIS, Demetrius 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*, Amsterdam, v. 43, p. 1526–1530, 2007.