



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
ESCOLA DE FARMÁCIA



LUCAS GOMES LEÃO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA ANÁLISE DE
ACICLOVIR EM PLASMA POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA**

OURO PRETO

2026

Lucas Gomes Leão

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA
ANÁLISE DE ACICLOVIR EM PLASMA POR CROMATOGRÁFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Morais Ruela
Coorientadora: MsC. Gabriela Roberta Ramos Fernandes

Ouro Preto
2026

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

L437d Leao, Lucas Gomes.

Desenvolvimento de método bioanalítico para análise de Aciclovir em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. [manuscrito] / Lucas Gomes Leao. - 2026.

33 f.: il.: color., tab..

Orientador: Prof. Dr. André Luis Ruela.

Coorientadora: Ma. Gabriela Roberta Fernandes.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Aciclovir. 2. Cromatografia líquida. 3. Farmacocinética. I. Ruela, André Luis. II. Fernandes, Gabriela Roberta. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 543.544(043)

Bibliotecário(a) Responsável: ELIANE SILVA DE SOUSA - SIAPE:2.543.323



FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas Gomes Leão

Desenvolvimento de método bioanalítico para análise de aciclovir em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência

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 11 de março de 2026

Membros da banca

Doutor - André Luís Morais Ruela - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutora - Gabriela Roberta Ramos Fernandes - Coorientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutora - Rafaela Cunha Matosinhos - Universidade Federal de Ouro Preto
Mestra - Priscila Pires da Silva - 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 11/03/2026



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luis Morais Ruela, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 11/03/2026, às 21:42, 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 **1073907** e o código CRC **D9BD5C36**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo infinito amor e cuidado, pelos suprimentos físicos e mentais nas horas de necessidade. Que toda minha trajetória em Ouro Preto e meus próximos passos como farmacêutico, seja para sua honra e glória.

Agradeço ao meu pai Antônio Marcos Leão e minha mãe Fabiana de Cássia Gomes da Silva, que mesmo embaixo de tanto sol, me trouxeram até aqui na sombra, sem vocês dois nada disso seria possível, vocês serão sempre os grandes amores da minha vida.

Agradeço aos meus avós paternos, Amado Rosa Leão (*in memoriam*) e Deusdete de Moraes, também meus avós maternos, Vitoriano Veríssimo da Silva (*in memoriam*) e Maria Rocha Gomes, por estes nunca terem desistido, mesmo em situações difíceis da vida, persistiram e criaram muito bem os filhos e por isso, hoje estou aqui.

Agradeço a todos meus familiares, em especial meus primos Marcos Vinicius Gomes Coelli, Matheus Araújo da Silva, Heitor Leão Oliveira e Tulio Leão Oliveira, por me ensinar o significado de família e terem me apoiado tanto nesse meu sonho e trajetória.

Agradeço, também, a todas as pessoas do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da UFOP, que foi o lugar que aprendi lições acadêmicas, de vida, criei amigos e aprendi a amar a pesquisa e a ciência, em especial meu orientador Professor Doutor André Luís Moraes Ruela e a minha coorientadora Mestra Gabriela Roberta Ramos Fernandes.

Agradeço aos meus amigos de caminhada e curso em Ouro Preto, que foram essenciais para manter dias agradáveis e a boa saúde mental, que o fim do curso nunca seja um adeus, mas sim um até breve, esperando um reencontro no futuro com todos aqueles que fizeram parte da minha vida. Em especial a Ana Clara Contarelli Soares, que além de minha melhor amiga, é minha companheira da vida, me ensinando o verdadeiro significado de amar e apoiar quem ama.

Por fim, agradeço a Universidade Federal de Ouro Preto e a gloriosa Escola de Farmácia da UFOP por ter me acolhido, me feito sentir em casa e realmente, hoje tenho a convicção que a minha cidade do coração se chama Ouro Preto, serei eternamente grato pelas memórias e oportunidades.

RESUMO

A análise de fármacos em fluidos biológicos exige métodos bioanalíticos seletivos e sensíveis. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é amplamente utilizada para quantificação de fármacos, metabólitos e bioativos em amostras biológicas coletadas de humanos e animais, sendo a técnica mais usada para quantificação aplicada a estudos farmacocinéticos. Para assegurar resultados confiáveis, é necessário validar a metodologia bioanalítica conforme a RDC nº 941/2024. Além disso, o preparo adequado da amostra é fundamental para reduzir interferentes e alcançar melhores resultados de sensibilidade e seletividade no método cromatográfico. Nesse sentido, este projeto realizou o desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica para quantificação de aciclovir em plasma de rato, visando sua aplicação em ensaios farmacocinéticos de novas formulações orais de liberação modificada. Para isso, amostras de plasma de rato foram fortificadas com concentrações conhecidas de aciclovir (substância química de referência), e o preparo de amostras foi realizada por precipitação de proteínas, incluindo a adição de um padrão interno (ganciclovir). As condições cromatográficas para a separação por CLAE foram devidamente otimizadas: utilizou-se uma coluna com recheio fenil (250 x 4,6 mm d.i.) em forno a 30° C, fase móvel composta por água acidificada com 1% v/v de ácido acético, empregando um fluxo de 1,0 mL/min. A detecção do aciclovir foi realizada no UV a 252 nm, com injeção de 20 µL da amostra preparada. O método bioanalítico desenvolvido foi sensível, preciso, exato, linear e seletivo, sem observar efeitos residuais entre injeções das amostras. Com isso, validou-se um método bioanalítico para quantificar o aciclovir em plasma de rato, com potencial aplicação em estudos farmacocinéticos de novas formulações.

Palavras-Chave: Aciclovir, Método bioanalítico, Cromatografia líquida, Farmacocinética

ABSTRACT

The drugs analysis in biological fluids requires selective and sensitive bioanalytical methods. High-performance liquid chromatography (HPLC) is widely used for quantification in samples withdrawn from humans and animals, being the most commonly employed technique for measuring drugs in pharmacokinetic studies. To ensure reliable results, the methodology must be validated in accordance with RDC No. 941/2024. In addition, a sample preparation step is essential to reduce interferences, achieving better sensitivity and selectivity in the chromatographic system. In this context, this project developed a bioanalytical method for the quantification of acyclovir in rat plasma, aiming at its application in pharmacokinetic assays of novel modified-release formulations. For this purpose, rat blood samples were spiked with known concentrations of acyclovir (reference chemical substance), and sample preparation was carried out by protein precipitation, including the addition of an internal standard (ganciclovir). The chromatographic conditions for HPLC separation were properly optimized: a phenyl-packed column was used in an oven at 30 °C, with a mobile phase consisting of water acidified with 1% acetic acid, at a flow rate of 1.0 mL/min. Detection of acyclovir was performed by UV at 252 nm, with injection of 20 µL of the prepared sample. The developed method proved to be sensitive, precise, accurate, linear, and selective, with no carryover effects observed between sample injections. Thus, a bioanalytical method was validated for quantifying acyclovir in rat plasma, with potential application in pharmacokinetic studies of novel formulations.

Keywords: Acyclovir, Bioanalytical method, Liquid chromatography, Pharmacokinetics

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Cálculo de precisão em desvio padrão relativo (DPR).....	22
Equação 2: Cálculo de exatidão em erro relativo (ER%)	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das estruturas químicas do Aciclovir (A) e do Ganciclovir (B)	15
Figura 2 – Esquema representativo da obtenção e preparo da amostra de plasma.....	20
Figura 3 – Seletividade do método, sendo azul o cromatograma da solução mista com o pico do ganciclovir (1) e o pico do aciclovir (2). Em preto, tem-se o cromatograma da matriz.....	24
Figura 4 – Curva de calibração de baixa concentração para avaliação da linearidade do método	25
Figura 5 – Curva de calibração de alta concentração para avaliação da linearidade do método	26
Figura 6 – Comparação entre cromatograma com o limite inferior de quantificação (LIQ) (pico em azul, dentro da marcação em vermelho) e cromatograma da matriz plasmática não fortificada (em rosa)	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições testadas no sistema de cromatografia à líquido de alta eficiência, em modo fase reversa, para desenvolvimento do método bioanalítico para quantificação do aciclovir em plasma de rato.	18
Tabela 2 – Precisão e exatidão em 3 dias - intracorrída (curva em intervalo de baixa concentração) (n=5)	26
Tabela 3 – Precisão e exatidão intercorridas (curva em intervalo de baixa concentração) (n=15)	27
Tabela 4 – Precisão e exatidão no primeiro dia (curva em intervalo de alta concentração) (n=5)	28
Tabela 5 – Precisão e exatidão intercorridas (curva em intervalo de alta concentração) (n=15)	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ACV - Aciclovir
BSC - Sistema de Classificação Biofarmacêutica (Biopharmaceutics Classification System)
CAS - Chemical Abstracts Service
CCD - Cromatografia em Camada Delgada
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CQ - Controle de Qualidade
CQA - Controle de Qualidade de Alta concentração
CQB - Controle de Qualidade de Baixa concentração
CQM - Controle de Qualidade de Média concentração
DPR - Desvio Padrão Relativo
ER% - Erro Relativo
HPLC - High Performance Liquid Chromatography
HSV - Herpes Simplex Virus
LIQ - Limite Inferior de Quantificação
Log P - Coeficiente de partição octanol/água
LSQ - Limite Superior de Quantificação
nm - Nanômetro
pKa - Constante de dissociação ácida
PI - Padrão Interno
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
SQR - Substância Química de Referência
UV - Ultravioleta
v/v - Volume/volume
VZV - Varicella Zoster Virus
µg/mL - Micrograma por mililitro
ng/mL - Nanograma por mililitro
µL - Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Preparo de Amostra	11
1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	12
1.3 Validação Bioanalítica	13
1.4 Aciclovir	14
1.5 Justificativa do Estudo.....	15
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Substâncias Químicas de Referência (SQRs)	17
3.2 Equipamentos e acessórios.....	17
3.3 Condições cromatográficas.....	17
3.4 Soluções padrão.....	18
3.5 Obtenção e preparo de amostra.....	19
3.6 Padronização do intervalo linear, seletividade, precisão, exatidão do método	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Condições cromatográficas.....	22
4.2 Obtenção e preparo de amostra.....	23
4.3 Padronização do intervalo linear do método, linearidade, seletividade e precisão.....	24
5. CONCLUSÃO	31
6. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

Os métodos analíticos empregados para a determinação quantitativa de fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas são ferramentas fundamentais para gerar dados reprodutíveis e confiáveis. É essencial utilizar métodos analíticos bem caracterizados e validados para produzir resultados confiáveis e que possam ser interpretados de maneira satisfatória (SHAV, 2000).

O analito é um composto químico específico, como um fármaco ou bioativo, a ser mensurado em uma matriz, isto é, no meio no qual os analitos em estudo serão quantificados. Métodos bioanalíticos são aplicados na determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas (sangue, urina, plasma, fluido cefalorraquidiano, etc.) (BRASIL, 2012).

1.1 Preparo de amostra

O preparo de amostras biológicas é realizado previamente à sua injeção no sistema cromatográfico, sendo fundamental a redução dos interferentes provenientes da matriz biológica, principalmente proteínas, que podem aumentar o ruído de fundo, interagir com analito, adsorver na fase estacionária, acumular nos poros da coluna elevando a pressão do sistema, comprometendo a seletividade, a sensibilidade e a vida útil da coluna cromatográfica. Nesse contexto, a técnica de precipitação de proteínas do plasma destaca-se por sua simplicidade, rapidez e baixo custo, sendo amplamente empregada em análises bioanalíticas de rotina. Na amostra de plasma, adicionam-se agentes modificadores de pH (ácidos ou bases) como por exemplo o ácido perclórico, utilizado neste trabalho conforme descrito por Gottfried (1951), sais inorgânicos, como o sulfato de amônio, ou solventes orgânicos miscíveis em água, como metanol ou acetonitrila, que promovem a desnaturação e a consequente precipitação das proteínas plasmáticas (HONG et al.; 2016).

Após a adição do agente precipitante, a amostra é homogeneizada e submetida à centrifugação, etapa na qual as proteínas precipitam e formam um pellet, permitindo a separação do sobrenadante, que contém o analito de interesse. Esse sobrenadante é então cuidadosamente coletado e pode ser submetido ou não a uma etapa adicional de neutralização ou diluição, dependendo das características do método cromatográfico e da estabilidade do

analito. Em seguida, a amostra apresenta compatibilidade para injeção no sistema cromatográfico (VAGHELA et al., 2016).

1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE é uma técnica de separação amplamente empregada no desenvolvimento de métodos analíticos e bioanalíticos, tanto para fins qualitativos quanto quantitativos. Sua extensa aplicação está relacionada à elevada sensibilidade, à alta seletividade e à grande versatilidade, permitindo a separação e a quantificação de diferentes classes de moléculas orgânicas. Essas características tornam a CLAE especialmente relevante na indústria farmacêutica, no controle de qualidade e em estudos envolvendo matrizes complexas, como fluidos biológicos. (TONHI Et Al., 2002)

O princípio fundamental da CLAE baseia-se em interações diferenciais entre os analitos e as fases móvel e estacionária, o que resulta em diferentes tempos de retenção de acordo com as propriedades físico-químicas de cada composto (FEKETE, S., 2014). A eficiência da separação cromatográfica pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo o tamanho das partículas da fase estacionária, o comprimento da coluna e a composição da fase móvel, além de parâmetros operacionais como temperatura e pressão do sistema. O controle adequado dessas variáveis é essencial para garantir separações eficientes, reprodutíveis e confiáveis (MEYER, 2010).

A cromatografia líquida teve início no começo do século XX com a chamada cromatografia em coluna clássica, na qual uma amostra era aplicada sobre um material sólido contido em uma coluna de vidro, e a separação ocorria à medida que o solvente fluía por gravidade. Os componentes da amostra migravam a diferentes velocidades, permitindo sua separação visual, especialmente quando compostos coloridos eram utilizados. Posteriormente, as frações eluídas eram coletadas, o solvente evaporado e os compostos isolados para análise. Apesar de sua eficácia, esse método era trabalhoso, lento e totalmente manual, exigindo uma nova coluna para cada análise. Na década de 1940, surgiram técnicas mais simples, como a cromatografia em papel e, posteriormente, a cromatografia em camada delgada (CCD), que proporcionaram maior praticidade, possibilidade de analisar múltiplas amostras simultaneamente e detecção facilitada dos compostos separados. (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010)

A evolução culminou com o desenvolvimento da CLAE, introduzida no final da década de 1960, que trouxe automação, maior rapidez e elevada reprodutibilidade às análises cromatográficas. Nesse sistema, as amostras são injetadas automaticamente, o solvente é bombeado sob alta pressão e os analitos são detectados continuamente à medida que eluem da coluna, gerando um cromatograma controlado por computador. O uso de colunas reutilizáveis, bombas de alta pressão e detectores sensíveis permitiu separações mais eficientes e precisas. A partir da década de 1990, o HPLC consolidou-se como uma técnica madura e amplamente difundida, sendo atualmente uma das principais ferramentas analíticas em laboratórios de pesquisa, indústria e controle de qualidade, com impacto científico e econômico superior ao de outras técnicas analíticas. (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010)

1.3 Validação Bioanalítica

A validação bioanalítica é conduzida conforme resoluções específicas, as Resoluções da Diretoria Colegiada (RDCs) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Atualmente, a RDC nº 27/2012 foi revogada pela RDC nº 941/2024, que visa harmonizar o processo de validação bioanalítica com diretrizes internacionais, tornando-o mais atualizado e flexível. A RDC nº 27/2012 apresentava requisitos específicos e maiores detalhamentos para a validação bioanalítica, conforme a aplicação pretendida do método bioanalítico. Essa resolução estabeleceu critérios obrigatórios para a validação de métodos bioanalíticos aplicados a estudos de registro e pós-registro de medicamentos no Brasil, assegurando a confiabilidade, a qualidade e a rastreabilidade dos resultados analíticos obtidos ao longo do desenvolvimento e da avaliação de medicamentos (BRASIL, 2012; BRASIL, 2024).

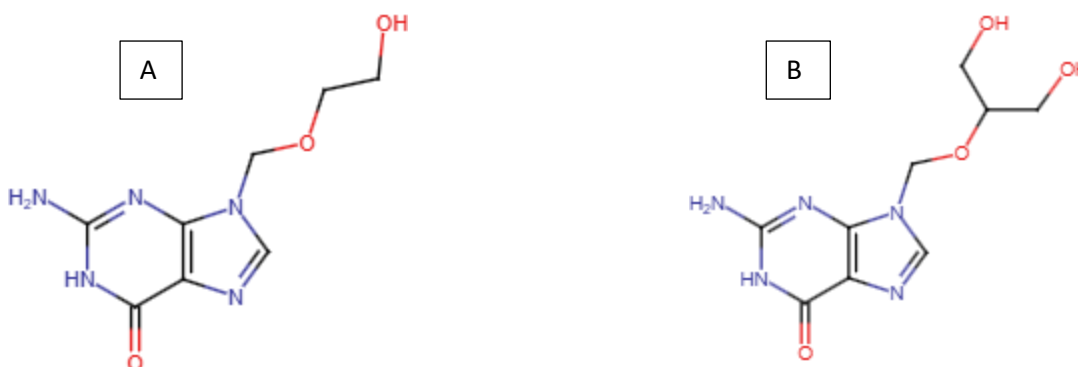
Entre os principais parâmetros descritos na RDC nº 941/2024, destaca-se a curva de calibração, que correlaciona a resposta analítica com concentrações conhecidas do analito, permitindo a interpolação de concentrações desconhecidas e a avaliação da linearidade do método. A seletividade é avaliada para demonstrar que o analito e o padrão interno (PI) são quantificados de forma específica, mesmo na presença de interferentes da matriz biológica. A precisão indica a reprodutibilidade do método sob diferentes condições, enquanto a exatidão avalia o quão próximo o valor medido está do valor real. A sensibilidade é expressa pelo limite inferior de quantificação, refletindo a capacidade do método de detectar e quantificar baixas concentrações do analito (BRASIL, 2024).

Além desses parâmetros, a RDC vigente, também aborda o efeito matriz, que avalia a influência dos componentes da matriz biológica na resposta analítica, podendo afetar os sinais e os resultados obtidos. O efeito residual é analisado para verificar possíveis interferências causadas por resíduos remanescentes no sistema analítico, como na agulha ou no injetor do equipamento. Por fim, a estabilidade garante que o analito permaneça inalterado e quantificável durante todas as etapas analíticas (BRASIL, 2024).

1.4 Aciclovir

O aciclovir, 2-amino-9-(2-hidroxi-etoximetil)-1 H -purin-6-ona, ($C_8H_{11}N_5O_3$, massa molar = 225.2 g/mol, CAS - 59277-89-3) se apresenta como um pó cristalino branco, com ponto de fusão de 255 °C seguido de decomposição química (Figura 1). É pouco solúvel em água e solúvel em soluções de ácidos e bases minerais diluídas, com valor de constante de dissociação ácida (pKa) de 2,3 e coeficiente de partição n-octanol/água (Log P octanol/água) de -1,66. O ganciclovir, 2-amino-9-[[1,3-dihidroxi-propan-2-il]oxi]metil}-6,9-di-hidro-3H-purin-6-ona, é um fármaco antiviral ($C_9H_{13}N_5O_4$, massa molar = 255.2 g/mol, CAS - 82410-32-0) quimicamente análogo ao aciclovir, sendo por isso selecionado como padrão interno neste trabalho. Apresenta propriedades físico-químicas também similares ao aciclovir, sendo um pó cristalino branco ou esbranquiçado, com ponto de fusão de 250 °C seguido de decomposição química. É solúvel em água a 25 °C (2,6 g/L) e solução de pH 7,0 (4,3 g/L), com valores de pKa de 2,2 e 9,4 e Log P octanol/água de -1,66 (MOFFAT et al., 2011; O'NEIL, 2013).

Figura 1 - Representação das estruturas químicas do Aciclovir (A) e do Ganciclovir (B)



Fonte: Autor (2025)

O aciclovir é um fármaco análogo de nucleosídeo amplamente utilizado no tratamento de infecções causadas por herpesvírus, incluindo o vírus herpes simplex (HSV), responsável pelo herpes labial e genital, e o vírus varicela-zoster (VZV), agente etiológico da catapora e do herpes zoster. Seu mecanismo de ação baseia-se, de forma geral, na inibição da DNA polimerase viral, interferindo diretamente nos processos essenciais de replicação do vírus e, consequentemente, limitando a progressão da infecção (KLYSIK et al., 2018).

Diversas formulações orais de aciclovir estão disponíveis comercialmente, como comprimidos, cápsulas e suspensões. No entanto, devido à sua baixa biodisponibilidade oral, estimada entre 10% e 30%, são necessárias doses diárias elevadas para alcançar efeito terapêutico adequado, podendo chegar a até 4 g por dia, administrados como 800 mg cinco vezes ao dia. No Brasil, a maior dosagem oral disponível é de 400 mg, sendo o fármaco classificado como Classe III segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, enquanto em outros países existem formulações de 800 mg, nas quais o aciclovir é classificado como Classe IV (ARNAL ET AL., 2008). Diante dessas limitações, o desenvolvimento de novas formulações visando aumentar a biodisponibilidade oral do aciclovir torna-se relevante. Diversos estudos farmacocinéticos em modelos animais utilizando métodos bioanalíticos por CLAE já foram conduzidos. Contudo, até o momento, não há registro de um medicamento que promova de forma efetiva o aumento da biodisponibilidade oral desse fármaco (PATEL; SWANT, 2007; BHALEKAR ET AL., 2014; NAIR ET AL., 2014; CHEN ET AL., 2019).

1.5 Justificativa do Estudo

O desenvolvimento de metodologias bioanalíticas é importante no sentido de delinear ensaios pré-clínicos com formulações inovadoras para o aciclovir. Sendo assim, este trabalho propõe padronizar um método cromatográfico, incluindo a etapa de preparo de amostras, para análise do aciclovir por CLAE em plasma de rato.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um método bioanalítico para a quantificação de aciclovir em matriz biológica (plasma de rato) empregando CLAE.

2.2 Objetivos específicos

- Definir condições cromatográficas, incluindo seleção da fase estacionária, composição da fase móvel, fluxo e volume de injeção e tipo de coluna cromatográfica;
- Definir um método de preparo de amostra biológica de plasma de rato por meio da técnica de precipitação de proteínas;
- Conduzir a validação bioanalítica avaliando a curva de calibração, seletividade, precisão, exatidão, sensibilidade, efeito residual.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento deste estudo foi viabilizado pela infraestrutura do Laboratório de Controle de Qualidade de insumos, fármacos e medicamentos (LCQ - 6 Laboratório 31), laboratório multiusuário do CiPharma (LM1) e Centro de Ciência Animal (CCA). Estes laboratórios estão localizados no campus Morro do Cruzeiro da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). O material biológico (plasma de ratos Wistar) foi coletado considerando o protocolo previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP sob nº 5599050924.

3.1 Substâncias Químicas de Referência (SQRs)

Aciclovir padrão (Sigma-Aldrich. Envase/lote: P500254. Teor: 94,9% tal qual. Umidade: 4,7% determinada por Karl Fisher. Guanina: 0,3%. Impurezas: 0,4%); Ganciclovir padrão (Sigma-Aldrich).

3.2 Equipamentos e acessórios

Agitador magnético com aquecimento modelo C-MAG HS 7 marca IKA; banho ultrassom modelo Ultrasonic Clear marca Unique; balanças analíticas de precisão Shimadzu; bomba de vácuo modelo MA057/2 marca Marconi; centrífuga refrigerada modelo Z 400 K marca Hermle; sistema de filtração de fase móvel; bomba de vácuo; sistema de cromatografia líquida de ultra alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE-UV) modelo Ultimate 3000 marca ThermoFisher Scientific; colunas para uso em sistema CLAE marca Waters, modelo Xterra, com dimensões de 250 mm x 4,6 mm; 5 µm de diâmetro das partículas; com recheio fenil e octilsilano (C8); pré-coluna para uso em sistema CLAE; espectrofotômetro UV-Vis (ultravioleta-visível); estufa de secagem; medidor de pH; micropipetadores automáticos; agitador de Tubos Certomat MV (Vórtex) - Agitador de tubos de ensaio, vortex, marca b. Braun biotech international; capela de exaustão; filtros de seringa PVDF; membrana de filtração de fase móvel PVDF com porosidade de 0,22 µm; vials de vidro de 2 mL; vidrarias de uso geral (béqueres, balões volumétricos, provetas, bastões de vidro, entre outros).

3.3 Condições cromatográficas

Para a separação cromatográfica foi utilizado um sistema de CLAE. As variáveis que

foram testadas no desenvolvimento do método cromatográfico foram: fase móvel e eluição conforme as condições 1 e 2 (tabela 1) baseadas no método proposto por KHARIA E SINGHAI (2015), e 3 e 4 (tabela 1) baseadas no método proposto por GHOSH ET AL. (2006), a condição 5 é baseada em experiências prévias do laboratório, sendo metanol modificador orgânico e ácido acético para ajuste do pH no componente aquoso. Os seguintes fluxos testados: 0,5mL/min, 0,8mL/min, 1,0mL/min e 1,2mL/min.

As condições cromatográficas incluíram o uso de colunas C8 e fenil, volume de injeção de 20 µL e temperatura de forno a 30 °C. O tempo de análise foi definido com base no tempo de retenção do aciclovir, assegurando uma corrida proporcional à eluição dos picos de interesse.

Tabela 1- Condições testadas no sistema de cromatografia à líquido de alta eficiência, em modo fase reversa, para desenvolvimento do método bioanalítico para quantificação do aciclovir em plasma de rato.

Condição	Coluna cromatográfica	Eluição	Composição da fase móvel	Deteccção ultravioleta
1	Octilsilano, C8, 250x4,6mm, 5 µm	Isocrático	Ácido Acético 1% v/v (97%): Metanol (3%)	252nm
2		Gradiente	Ácido Acético 1% v/v: Metanol	
3		Isocrático	Ácido Acético 1% v/v contendo de 5 a 15 mM de LSS: Metanol	
4		Gradiente		
5	Fenil, 250x4,6mm, 5 µm	Isocrático	Ácido Acético 1% v/v	

Fonte: Autor (2025)

3.4 Soluções padrão

A solução estoque de aciclovir foi preparada pesando 12,50 mg de aciclovir, transferindo para balão de 25 mL, adicionando 15 mL de água ultrapura. Em seguida levada ao banho de ultrassom por 20 minutos, sem aquecimento. Após retirada do banho de ultrassom, completou-se o volume com água ultrapura. A concentração final foi de 500 µg/mL, equivalente a 0,5 mg/mL.

A solução de concentração intermediária de aciclovir foi preparada com a transferência

de 5,0 mL da solução estoque de aciclovir para balão de 50 mL. Completou-se o volume com água ultrapura. A concentração final foi de 50 µg/mL, equivalente a 0,05 mg/mL.

A solução estoque de ganciclovir foi preparada pesando 10,00 mg de ganciclovir, transferindo para balão de 25 mL, adicionando 15 mL de água ultrapura. Em seguida levada ao banho de ultrassom por 20 minutos, sem aquecimento. Após retirada do banho de ultrassom, completou-se o volume com água ultrapura. A concentração final foi de 400 µg/mL, equivalente a 0,4 mg/mL.

A solução de concentração intermediária de ganciclovir foi preparada transferindo 12,5 mL da solução estoque de ganciclovir para balão de 50 mL. Completou-se o volume com água ultrapura. A concentração final foi de 100 µg/mL, equivalente a 0,1 mg/mL.

A solução estoque de padrão e padrão interno foram armazenadas em geladeira (5 a 10 °C). No dia da análise, retirou-se da geladeira com 1 hora de antecedência, agitou-se em vórtex por 1 minuto, e procedeu-se com a diluição.

Para compor a fase móvel, a fase aquosa foi preparada pela adição de ácido acético (grau analítico) à água ultrapura na proporção de 1% (v/v). Após a homogeneização, a solução foi filtrada sob vácuo em membrana de nylon (KASVI, 47 mm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade). Para garantir a eliminação de gases dissolvidos e evitar instabilidades na linha de base do cromatógrafo, a fase foi mantida em banho de ultrassom por 30 minutos para desgaseificação.

Para a solução de ácido perclórico utilizado para a precipitação de proteínas plasmáticas foram testadas concentrações diferentes, sendo:

1% v/v - adicionou-se 20 mL de água ultrapura em um balão de 50 mL. Adicionou-se lentamente 0,71 mL de ácido perclórico 70%, em capela de exaustão. Após atingir temperatura ambiente completou-se o volume com água ultrapura.

7% v/v - adicionou-se 20 mL de água ultrapura em um balão de 50 mL. Adicionou-se lentamente 5 mL de ácido perclórico 70%, em capela de exaustão. Após atingir temperatura ambiente completou-se o volume com água ultrapura.

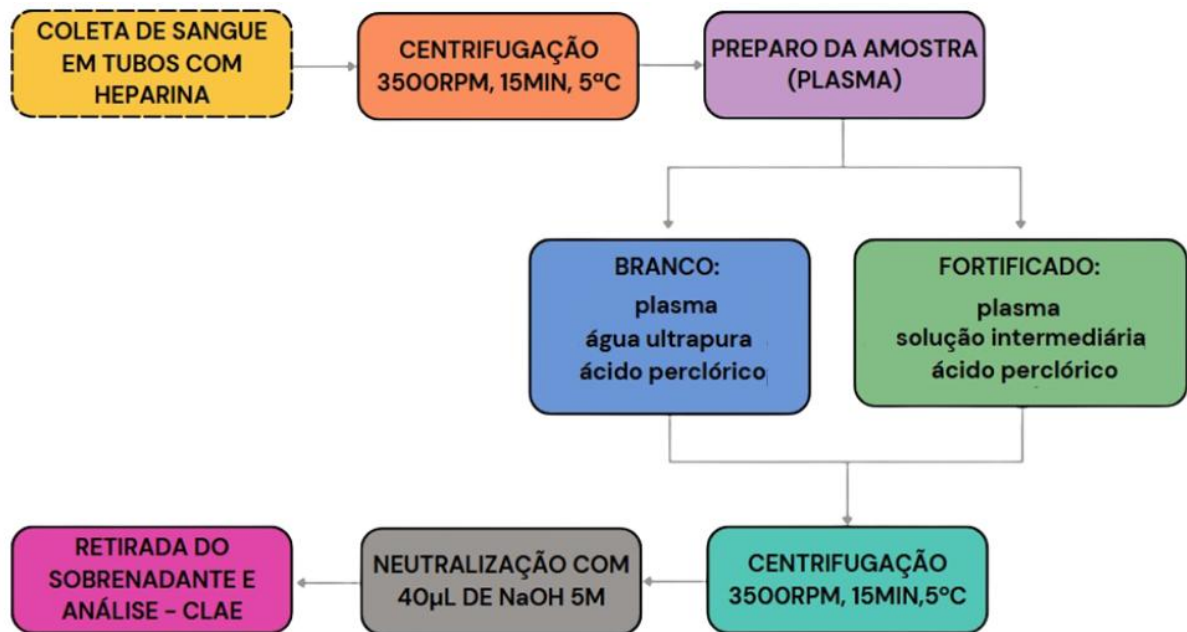
14% v/v - adicionou-se 20 mL de água ultrapura em um balão de 50 mL. Adicionou-se lentamente 10 mL de ácido perclórico 70%, em capela de exaustão. Após atingir temperatura ambiente completou-se o volume com água ultrapura.

3.5 Obtenção do plasma e preparo de amostra

O projeto experimental foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de

Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) protocolada sob o CEUA nº 5599050924. O preparo de amostra foi padronizado conforme a Figura 2, usando a solução de ácido perclórico a 14%.

Figura 2 - Esquema representativo da obtenção e preparo da amostra de plasma



Fonte: Autor (2025)

3.6 Padronização do intervalo linear do método: linearidade, seletividade e precisão.

Devido a flexibilidade normativa da RDC 941/2024, neste trabalho, optou-se por fundamentar a análise na RDC nº 27/2012, considerando sua aplicabilidade e maior clareza nos critérios técnicos pertinentes ao desenvolvimento do estudo.

Para a padronização do intervalo linear e avaliação da linearidade do método bioanalítico, foram construídas duas curvas de calibração independentes, correspondentes a diferentes faixas de concentração do analito, denominadas curva de baixa concentração e curva de alta concentração, visando abranger a variação esperada das concentrações plasmáticas de aciclovir em estudos farmacocinéticos.

A curva de calibração no intervalo de baixa concentração foi composta por amostras de plasma de rato fortificadas com aciclovir nas concentrações de 100, 150, 200, 300, 450, 500, 600, 700 e 800 ng/mL. A curva de calibração no intervalo de alta concentração foi composta por amostras de plasma de rato fortificadas com aciclovir nas concentrações de 2, 5, 10, 15, 20,

40, 60, 80 e 100 µg/mL, equivalente às concentrações de 2000, 5000, 10.000, 15.000, 20.000, 40.000, 60.000, 80.000 e 100.000 ng/mL, respectivamente. Em ambas as curvas, o ganciclovir foi empregado como padrão interno, sendo utilizado na concentração fixa de 500 ng/mL para a curva no intervalo de baixa concentração e 10000 ng/mL para a curva no intervalo de alta concentração.

As amostras de ambas as curvas de calibração foram preparadas a partir de três soluções estoque independentes do analito, com adição do padrão interno, processadas conforme o método de preparo de amostras previamente descrito (Figura 2) e analisadas por CLAE em triplicata. As áreas dos picos do aciclovir foram obtidas e normalizadas pela área do pico do padrão interno, e as curvas de calibração foram construídas correlacionando-se a razão das áreas (aciclovir/padrão interno) com as respectivas concentrações nominais do aciclovir.

O ajuste das curvas de calibração foi realizado por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, sendo avaliados o coeficiente de correlação (r), o coeficiente de determinação (r^2), o coeficiente angular e o intercepto da reta. A linearidade do método foi considerada adequada quando o coeficiente de determinação foi igual ou superior a 0,99, conforme os critérios estabelecidos pela RDC nº 941/2024.

A seletividade do método foi avaliada por meio da comparação entre cromatogramas de amostras de plasma em branco, amostras de plasma fortificadas com aciclovir e ganciclovir, e amostras contendo apenas o padrão interno, a fim de verificar a ausência de interferências endógenas da matriz biológica nos tempos de retenção do analito e do padrão interno, tanto no intervalo de baixa quanto no de alta concentração.

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas por meio da análise de amostras de plasma fortificadas com aciclovir em quatro níveis de concentração, para cada intervalo de concentração (intervalos baixo e alto): limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de média concentração (CQM) e controle de qualidade de alta concentração (CQA). Para a curva de baixa concentração, os níveis de controle de qualidade foram definidos dentro da respectiva faixa linear, enquanto para a curva no intervalo de alta concentração os níveis de controle de qualidade foram ajustados de modo a representar adequadamente LIQ, CQA, CQM e CQB.

O LIQ corresponde à menor concentração de aciclovir que pode ser quantificada no plasma com precisão e exatidão aceitáveis. O CQB representa um nível próximo ao limite inferior da faixa linear do método, sendo utilizado para avaliar o desempenho analítico em

baixas concentrações. O CQM situa-se na região central da curva analítica e permite verificar a precisão e a exatidão do método em concentrações intermediárias. Já o CQA localiza-se próximo ao limite superior da faixa linear, sendo empregado para confirmar a confiabilidade do método em concentrações elevadas do analito.

A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR%), e a exatidão como erro relativo (ER%), sendo avaliadas em uma única corrida analítica (precisão intracorrída) e em três corridas analíticas realizadas em dias distintos (precisão intercorridas), em quintuplicata para cada nível de concentração. Os critérios de aceitação adotados foram $DPR \leq 15\%$ e ER% dentro de $\pm 15\%$ para todos os níveis de controle de qualidade, exceto para o LIQ, para o qual foram aceitos valores de até 20%, conforme preconizado pela RDC nº 941/2024.

Para o cálculo da precisão utilizou-se fórmula matemática baseada no desvio padrão relativo que atendessem os critérios de análise

$$DPR = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Média}} * 100 \quad (1)$$

Para o cálculo da exatidão, procedeu-se da mesma forma para o Erro relativo:

$$ER\% = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor nominal}}{\text{valor nominal}} * 100 \quad (2)$$

Valor de referência: os valores devem estar dentro do intervalo de $\pm 15\%$ dos valores nominais ($\pm 20\%$ para o LIQ).

Efeito Residual: Foram realizadas 3 corridas de amostras em branco, sendo um antes e duas depois da injeção da amostra de concentração 800 ng/mL (LSQ). As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ. E também, as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% (cinco por cento) da resposta do PI.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condições cromatográficas

Dentre as fases móveis avaliadas (Tabela 1), a fase 5 foi a que apresentou o melhor desempenho cromatográfico, proporcionando adequada separação dos picos e melhor resolução do analito em relação aos interferentes da matriz biológica. Essa condição correspondeu a um sistema com eluição isocrática composto por água acidificada com 1% de ácido acético, empregando-se a coluna com recheio fenil ($250 \times 4,6$ mm; $5 \mu\text{m}$), com detecção do aciclovir no comprimento de onda de 252 nm. A detecção UV do aciclovir (252, 253 e 254 nm) foi reportada em 6 trabalhos revisados (Ghosh, et al. 2006; Patel; Sawant, 2007; Bhalekar et al., 2014; Kharia; Singhai, 2015; Madgulkar; Bhalekar; Dikpati 2016; Saifi, et al. 2020), assim a análise do aciclovir permaneceu em 252 nm.

Na condição 5, observou-se um pico bem definido, simétrico e com tempo de retenção do aciclovir que viabilizava todas as análises, evidenciando condições cromatográficas satisfatórias. Em contrapartida, as demais condições cromatográficas testadas não demonstraram seletividade satisfatória, uma vez que apresentaram picos provenientes da matriz com tempos de eluição próximos ou coincidentes ao do analito, dificultando sua identificação e quantificação. Dessa forma, a condição 5 apresentada na Tabela 1 foi selecionada como a mais adequada para a validação bioanalítica, por minimizar interferências da matriz e garantir separação eficiente do aciclovir.

De acordo com os fluxos de fase móvel avaliados, o fluxo de 1,0 mL/min apresentou o melhor desempenho cromatográfico, resultando em picos bem definidos, sem sobreposição e com adequada resolução entre o analito e os possíveis interferentes da matriz, além de otimizar o tempo total de corrida.

Observou-se que fluxos superiores a 1,0 mL/min geraram pressão muito alta no sistema de CLAE, considerando o uso de uma coluna com tamanho de 25 cm de comprimento.

Com base no método cromatográfico proposto e nas condições analíticas estabelecidas, o tempo total eluição foi definido em 16 minutos, sendo suficiente para a eluição completa da amostra. Observou-se um pico tardio, por volta de 10 minutos (Figura 3), relacionado a interferentes da matriz biológica, pico que poderia influenciar as análises em sequência, por isso foi necessário aumentar o tempo do método para a eluição deste pico tardio. Esta eluição de interferentes ocorreu após a eluição do aciclovir e do ganciclovir, que eluíram em aproximadamente 4,6 e 5,7 minutos, respectivamente.

4.2 Obtenção e preparo de amostra

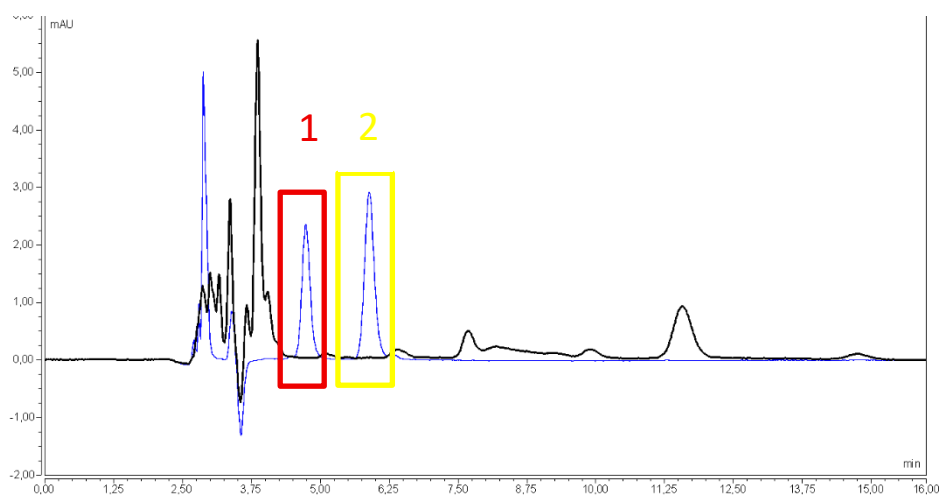
A utilização do ácido perclórico a 14% (v/v) no preparo das amostras se mostrou efetiva para a precipitação das proteínas plasmáticas, permitindo a remoção eficiente dos componentes interferentes da matriz biológica. Nessas condições, os picos correspondentes ao aciclovir e ao ganciclovir apresentaram boa resolução e seletividade em meio aos outros picos relativos a componentes do plasma utilizado na amostra. Os tempos de retenção foram compatíveis aos observados para amostras padrão injetadas após simples diluição em água, sem etapa prévia de extração, demonstrando também que o ácido perclórico nessa concentração não interferiu nas características de eluição cromatográfica das substâncias de interesse. Esse resultado evidencia que a concentração de 14% (v/v) foi suficiente para assegurar a seletividade do método e reduzir interferências relacionadas ao efeito de matriz.

Por outro lado, o uso de ácido perclórico nas concentrações de 1% e 7% (v/v) não foi satisfatório, uma vez que houve uma menor eficiência na precipitação das proteínas, resultando na permanência de interferentes plasmáticos, os quais apresentaram coeluição em tempos de retenção próximos ao do aciclovir, prejudicando a análise cromatográfica.

Após a precipitação com ácido perclórico a 14% (v/v), realizou-se a neutralização da amostra com a adição de 40 μ L de NaOH 5 M antes da injeção no sistema cromatográfico, etapa necessária para preservar a integridade da coluna, aumentando sua vida útil e contribuindo para aumentar a estabilidade química dos analitos durante a análise.

4.3 Padronização do intervalo linear do método: linearidade, seletividade e precisão.

Figura 3 - Seletividade do método, sendo azul o cromatograma da solução mista com o pico do ganciclovir (1) e o pico do aciclovir (2). Em preto, tem-se o cromatograma da matriz.

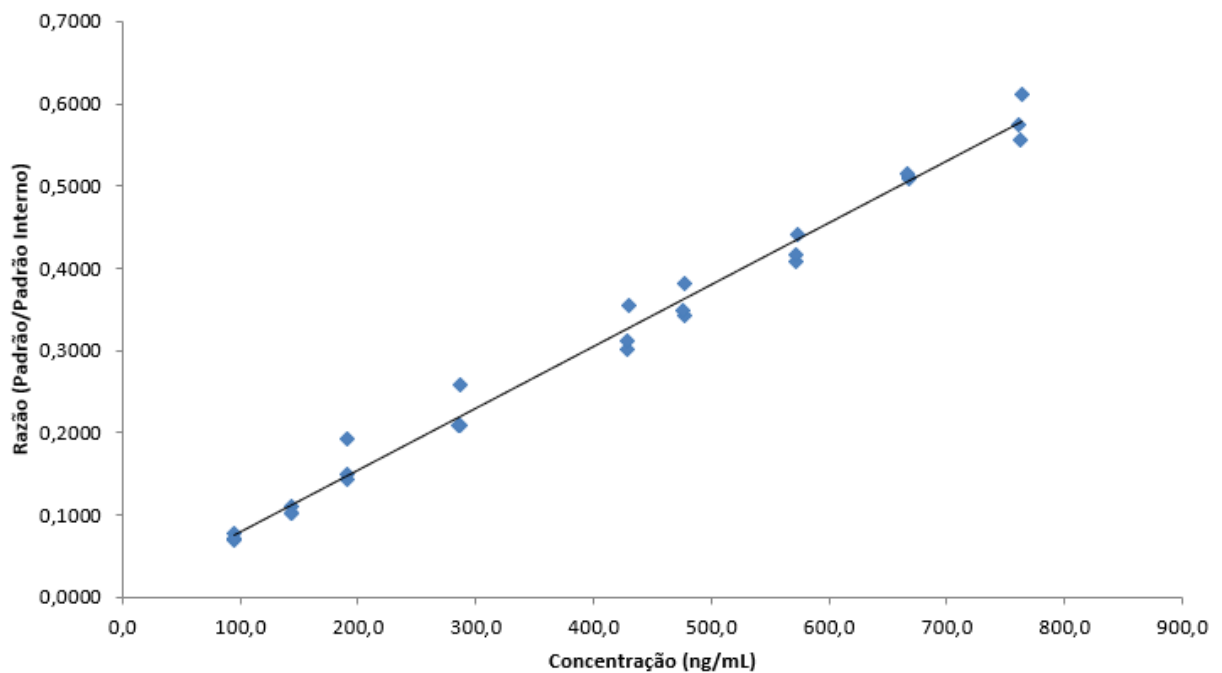


Fonte: Autor (2025)

Quanto à seletividade, nenhum pico proveniente da matriz plasmática coincidiu com os tempos de retenção do fármaco e do padrão interno nas mesmas condições cromatográficas, evidenciando que não houve interferência na identificação e quantificação dos analitos conforme mostrado na figura 3. A ausência de coeluição e a adequada resolução entre os picos confirmam a seletividade do método para a análise proposta.

No que se refere à linearidade, a regressão linear obtida para a faixa de concentração baixa apresentou coeficiente de correlação (r) de 0,99410 e coeficiente de determinação (r^2) de 0,98824, demonstrando adequada relação linear entre a resposta analítica e a concentração do analito na faixa avaliada. A curva de calibração de baixa concentração está apresentada na Figura 4.

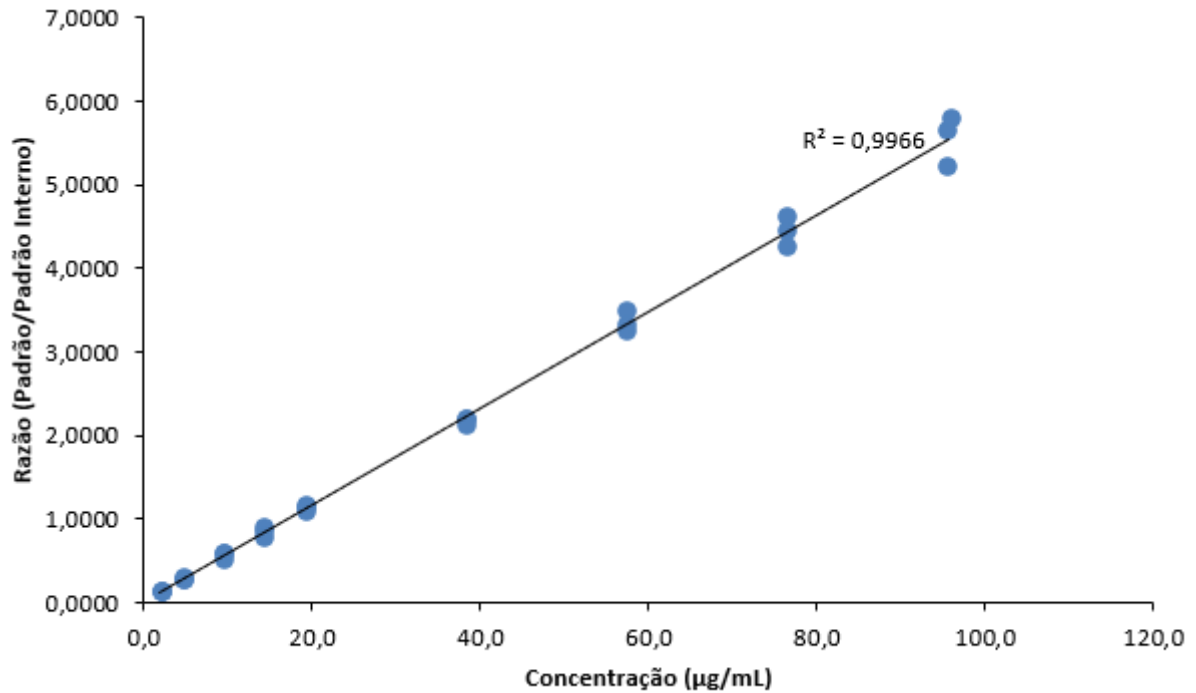
Figura 4 - Curva de calibração de baixa concentração para avaliação da linearidade do método.



Fonte: Autor (2025)

A regressão linear obtida para a faixa de concentração alta apresentou coeficiente de correlação (r) igual a 0,9983 e coeficiente de determinação (r^2) a 0,9966, compatível com os critérios estabelecidos pela RDC nº 941/2024, evidenciando que o método mantém linearidade adequada em concentrações mais elevadas do analito. A curva de calibração correspondente à faixa de alta concentração está apresentada na Figura 5.

Figura 5 - Curva de calibração de alta concentração para avaliação da linearidade do método.



Fonte: Autor

Os resultados demonstram que o método bioanalítico apresenta comportamento linear satisfatório em ambas as faixas de concentração avaliadas, possibilitando sua aplicação tanto para quantificação de baixas concentrações plasmáticas quanto para níveis mais elevados de aciclovir, ampliando o intervalo de trabalho do método.

Os dados para a análise de precisão e exatidão foram obtidos e transformados na Tabela 2 a seguir para a curva em intervalo de baixa concentração:

Tabela 2 - Precisão e exatidão em 3 dias - intercorridas (curva em intervalo de baixa concentração) (n=5).

DIA 1

Controles	[C] Teórica (ng/mL)	Média [C] Experimental (ng/mL)	ER%	DPR
LIQ	95,2	103,74	8,97	5,22

CQB	286,52	301,59	5,26	7,26
CQM	429,78	428,88	0,21	2,73
CQA	573,0	569,29	0,65	3,05

DIA 2

Controles	[C] Teórica (ng/mL)	Média [C] Experimental (ng/mL)	ER%	DPR
LIQ	95,2	99,84	4,87	3,63
CQB	286,52	306,72	7,05	7,40
CQM	429,78	445,82	3,73	6,99
CQA	573,0	545,88	4,73	5,02

DIA 3

Controles	[C] Teórica (ng/mL)	Média [C] Experimental (ng/mL)	ER%	DPR
LIQ	95,2	103,84	9,08	3,43
CQB	286,52	282,35	1,46	7,76
CQM	429,78	429,07	0,17	6,39
CQA	573,0	577,96	0,86	9,75

Fonte: Autor (2025)

Tabela 3 - Precisão e exatidão intracorridas (curva em intervalo de baixa concentração) (n=15).

Controles	[C] Teórica (ng/mL)	Média [C] Experimental (ng/mL)	ER%	DPR
LIQ	95,2	102,90	8,09	4,10
CQB	286,52	296,89	3,62	7,48
CQM	429,78	434,59	1,12	5,37
CQA	573,0	581,65	1,51	5,94

Fonte: Autor (2025)

Com base nos dados apresentados na Tabela 2 e Tabela 3 das curvas em intervalo de

baixa concentração, a avaliação da exatidão demonstrou resultados satisfatórios sendo até 15% de ER% o ideal, tanto na análise intercorridas, quanto intracorrida. A análise da exatidão entre três corridas diferentes (intercorridas) apresentou variação entre 0,17% e 9,08%, enquanto a exatidão na mesma corrida (intracorrida) variou de 1,12% a 8,09%, ficando dentro dos valores de referência supracitados, indicando concordância entre os valores obtidos experimentalmente. Esses resultados evidenciam que o método apresenta exatidão adequada dentro da faixa de concentração avaliada.

Em relação à precisão, os ensaios intercorridas apresentaram variações entre 2,73% e 9,75%, ao passo que a precisão intracorrida variou de 4,10% a 7,48%, também, estando dentro dos valores de referência requisitados, inferiores a 15%, refletindo a baixa dispersão dos resultados do método bioanalítico. Dessa forma, considerando os valores obtidos e os limites de aceitação estabelecidos, o método bioanalítico pode ser considerado preciso dentro da faixa de concentração avaliada.

Para a curva de alta concentração, obteve-se os seguintes dados:

Tabela 4 - Precisão e exatidão no intercorridas (curva em intervalo de alta concentração) (n=5).

DIA 1

Controles	[C] Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Média [C] Experimental ($\mu\text{g/mL}$)	ER%	DPR
LIQ	1,9	2,04	7,37	2,60
CQB	4,8	4,37	8,96	3,64
CQM	38,3	39,07	2,01	1,67
CQA	76,5	72,12	5,73	1,14

DIA 2

Controles	[C] Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Média [C] Experimental ($\mu\text{g/mL}$)	ER%	DPR
LIQ	1,9	2,01	5,79	0,91
CQB	4,8	5,42	12,92	1,62
CQM	38,3	37,93	0,97	0,89

CQA	76,5	69,88	8,65	3,43
------------	------	-------	------	------

DIA 3

Controles	[C] Teórica (µg/mL)	Média [C] Experimental (µg/mL)	ER%	DPR
LIQ	1,9	1,99	4,74	4,39
CQB	4,8	4,41	8,13	0,91
CQM	38,3	36,45	4,83	0,44
CQA	76,5	70,91	7,31	1,92

Fonte: Autor (2025)

Tabela 5 - Precisão e exatidão intracorrída (curva em intervalo de alta concentração) (n=15)

Controles	[C] Teórica (µg/mL)	Média [C] Experimental (ng/mL)	ER%	DPR
LIQ	1,9	2,00	5,41	2,63
CQB	4,8	5,18	7,93	2,06
CQM	38,3	38,95	1,70	1,00
CQA	76,5	82,04	7,24	2,16

Fonte: Autor (2025)

Com base nos dados apresentados na Tabela 4 e na Tabela 5 das curvas em intervalo de alta concentração, a avaliação da exatidão demonstrou resultados satisfatórios tanto na análise intercorridas, quanto intracorrída.

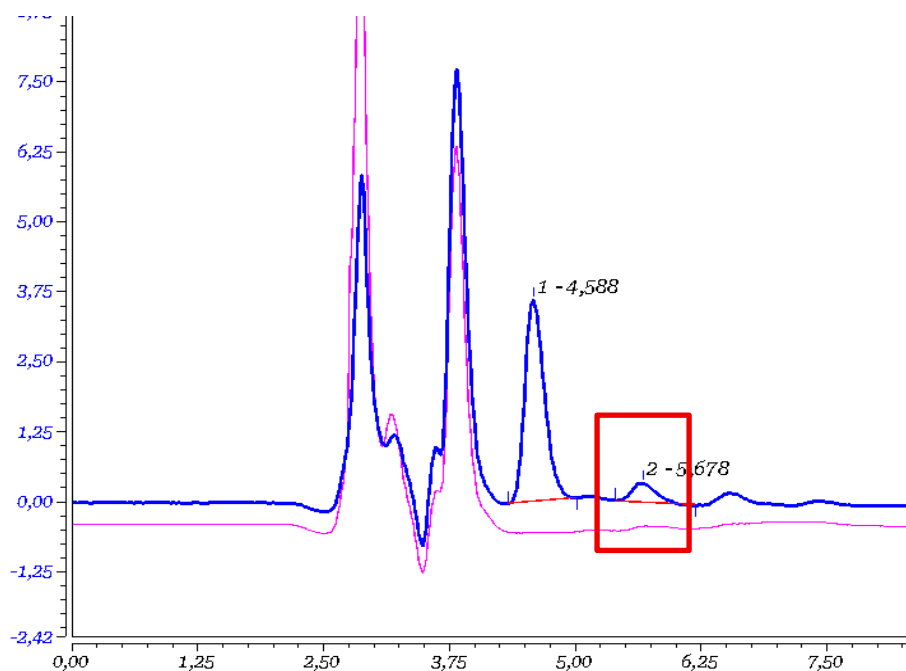
A análise da exatidão entre três corridas diferentes (intercorridas) apresentou variação entre 0,97% e 12,92%, enquanto a exatidão na mesma corrida (intracorrída) variou de 1,70% a 7,93%, ficando dentro dos valores de referência supracitados, indicando concordância entre os valores obtidos experimentalmente. Esses resultados evidenciam que o método apresenta exatidão adequada dentro da faixa de concentração avaliada.

Em relação à precisão, os ensaios intercorridas apresentaram variações entre 0,44% e 4,39%, ao passo que a precisão intracorrída variou de 1,00% a 2,63%, também, estando dentro

dos valores de referência requisitados, refletindo baixa dispersão dos resultados do método. Dessa forma, considerando os valores obtidos e os limites de aceitação estabelecidos, o método pode ser considerado preciso dentro da faixa de concentração avaliada.

No que tange a sensibilidade, o LIQ foi definido por 100 ng/mL, que foi o ponto mais baixo da curva testado que demonstrou precisão e exatidão (conforme dados da Tabela 2 e Tabela 3). O pico apresenta uma resposta pelo menos cinco vezes superior a qualquer interferência observada na matriz neste tempo de retenção, atendendo o critério para a sensibilidade, demonstrando-se um método sensível.

Figura 6 - Comparação entre cromatograma com o limite inferior de quantificação (LIQ) (pico em azul, dentro da marcação em vermelho) e cromatograma da matriz plasmática não fortificada (em rosa)



Fonte: Autor (2025)

Nas amostras em branco avaliadas após injeções de amostras fortificadas, não foram observados picos no tempo de retenção correspondente ao aciclovir (analito), nem ao ganciclovir (padrão interno), evidenciando a ausência de efeito residual no método.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a validação de um método

bioanalítico para a quantificação de aciclovir em plasma humano por CLAE, visando sua aplicação em estudos farmacocinéticos em estudo pré-clínico no modelo rato Wistar. As condições cromatográficas evidenciaram uma separação eficiente, boa resolução cromatográfica e resposta analítica satisfatória para o analito de interesse.

O método bioanalítico desenvolvido apresentou desempenho analítico consistente, atendendo aos critérios estabelecidos pela RDC nº 941/2024 quanto à seletividade, linearidade, precisão e exatidão. A validação bioanalítica contemplou tanto a curva de calibração em intervalo de baixa concentração quanto a curva em intervalo de alta concentração, permitindo a ampliação do intervalo de concentrações para quantificação pelo método, reduzindo a necessidade de diluição de amostras. Os resultados obtidos demonstraram reprodutibilidade intra e interdia, com valores de erro relativo e desvio padrão relativo dentro dos limites aceitáveis, confirmando a confiabilidade do método ao longo de toda a faixa de concentração avaliada.

A inclusão da curva de calibração contemplando intervalo de alta concentração representa um diferencial do presente estudo, uma vez que amplia a aplicabilidade do método para a quantificação de aciclovir em situações clínicas e experimentais que demandam a análise de concentrações mais elevadas. Dessa forma, o método desenvolvido mostrou-se robusto, sensível e adequado para a análise de aciclovir em plasma, podendo ser empregado em estudos futuros relacionados à farmacocinética, biodisponibilidade e avaliação terapêutica desse fármaco.

6. 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.

BHALEKAR, M. R. *et al.* Formulation and evaluation of acyclovir nanosuspension for enhancement of oral bioavailability. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 8, n. 2, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012**. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 941, de 18 de novembro de 2024**. Dispõe sobre a validação de métodos bioanalíticos e análise de amostras de estudo para submissões regulatórias de medicamentos industrializados de uso humano. **Diário Oficial da União**, Brasília: Ministério da Saúde, 2024.

CHEN, H. *et al.* The effect of amphiphilic N,N,N-trimethyl-O-octadecyl chitosan on the oral bioavailability of acyclovir. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 244–254, 2019.

FEKETE, S.; SCHAPPLER, J.; VEUTHEY, J. L.; GUILLARME, D. Current and future trends in UHPLC. **TrAC – Trends in Analytical Chemistry**, v. 63, p. 2–13, 2014.

KLYSIK, K. *et al.* Acyclovir in the treatment of herpes viruses: a review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 1–18, 2018.

KONG, R. *et al.* Protein precipitation. In: **Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC**. Separation Science and Technology, 2005. p. 154–156.

MEYER, V. R. **Practical high-performance liquid chromatography**. 5. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2010.

MOFFAT, A. C. *et al.* **Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 4. ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. 2609 p.

NAIR, A. B. *et al.* Enhanced oral bioavailability of acyclovir by inclusion complex using hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Drug Delivery**, v. 21, n. 7, p. 540–547, 2014.

NEUE, U. D. **HPLC columns: theory, technology, and practice**. New York: Wiley-VCH, 1997.

O'NEIL, M. J. (org.). **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013. p. 26.

PATEL, D.; SAWANT, K. K. Oral bioavailability enhancement of acyclovir by self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS). **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, n. 12, p. 1318–1326, 2007.

TONHI, E. *et al.* Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616–623, 2002.

VAGHELA, A. *et al.* Sample preparation in bioanalysis: a review. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 5, n. 5, p. 6–10, 2016.

GOTTFRIED, S. P.; ERDMAN, G. L. Use of perchloric acid as a protein precipitant in the determination of acid-soluble phosphates and nonprotein nitrogen in the blood. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 21, n. 2, p. 118–122, 1951.