



Validação de método de doseamento para aciclovir e aplicação em estudo de equivalência farmacêutica de creme contendo aciclovir

Lourenço, F.R.¹; Silva, A.C.D.²; Yamamoto, R.N.³; Pinto, T.J.A.^{4*}

¹Doutor pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

²Farmacêutica pela Universidade Paulista

³Farmacêutica-Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

⁴Professora Titular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP - CONFAR – Laboratório de Controle de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários e Produtos Afins e as Respectivas Matérias-Primas

Recebido 07/07/2009 / Aceito 12/04/2010

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivos validar método para o doseamento de aciclovir em creme por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e aplicá-lo em estudo de equivalência farmacêutica entre medicamento de referência, genérico e similar. O método proposto para doseamento de aciclovir em creme por espectrofotometria de absorção no ultravioleta foi validado, mostrando especificidade/seletividade, linearidade e faixa linear, limite de detecção/quantificação, exatidão e precisão adequados para o uso pretendido. Os medicamentos foram avaliados quanto aos testes de peso médio, limite de guanina por cromatografia em camada delgada, identificação por espectrofotometria de absorção no ultravioleta, contagem microbiana de bactérias e fungos, pesquisa de microrganismos patogênicos e doseamento por espectrofotometria de absorção no ultravioleta. Os três medicamentos atenderam as especificações para os testes avaliados e, portanto, podem ser considerados equivalentes farmacêuticos.

Palavras-chave: Aciclovir. Validação de método. Equivalência farmacêutica.

INTRODUÇÃO

O aciclovir, quimicamente denominado 9-[(2-hidro-xietoxi)metil]-9H-guanina (Figura I), é um análogo acíclico do nucleosídeo guanina utilizado no tratamento de infecção por herpesvírus. Apresenta atividade *in vitro* contra o HSV-1 (0,02 a 0,9 µg/ml), HSV-2 (0,03 a 2,2 µg/ml), VZV (0,8 a 4,0 µg/ml), o vírus Epstein-Barr (EBV),

citomegalovírus (CMV) e o herpesvírus humano (HHV-6). O mecanismo de ação do aciclovir se dá pela inibição da síntese de DNA viral (Brunton et al., 2006).

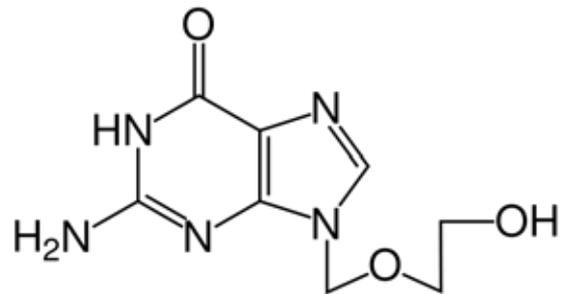


Figura I: Estrutura molecular do aciclovir

Dentro da política nacional de saúde está o programa de medicamentos genéricos, garantido pelas resoluções aprovadas, sendo a mais recente em 02 de março de 2007 – RDC nº 16 (Brasil, 2007). A intercambialidade do medicamento é aceita após estudos de equivalência farmacêutica e, quanto pertinente, bioequivalência (Brasil, 2004).

A farmacopéia americana (USP, 2009) apresenta método para análise de aciclovir em creme por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta. Na monografia da farmacopéia britânica (British Pharmacopoeia, 2008), o método descrito é por espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

Embora exista monografia para o produto em compêndios internacionais (USP, 2009; British Pharmacopoeia, 2008), o presente trabalho tem por objetivo estabelecer método para o doseamento de aciclovir em creme por espectrofotometria de absorção no ultravioleta, com a finalidade de contribuir na elaboração de monografia para aciclovir creme a ser adotada em futuras edições da Farmacopéia Brasileira. Também é objetivo deste trabalho aplicar o método validado em estudo de equivalência farmacêutica entre medicamento de referência, genérico e similar.

Autor correspondente: Terezinha de Jesus Andreoli Pinto - Departamento de Farmácia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo (USP) - Av. Prof. Lineu Prestes, 580- Bloco 13 - CEP.05508-900 - Butantã - São Paulo - SP - Brasil - Fone: (11) 3091-3667 - e-mail: tjapinto@usp.br

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras e Substância Química de Referência

Foram avaliados três medicamentos de diferentes laboratórios, sendo um o medicamento de referência (Lote: KM0029V), um genérico (Lote: 801025) e um similar (Lote: 42127), todos contendo 50 mg/g. Os medicamentos foram adquiridos no mercado. Foi utilizada substância química de referência de aciclovir (Lote: 1021) fornecida pela Farmacopéia Brasileira.

Validação do método de doseamento de aciclovir por espectrofotometria de absorção no ultravioleta

Foram avaliadas amostras preparadas em condições de estresse (hidrólise ácida, hidrólise alcalina, oxidação e aquecimento) para avaliação da especificidade/seletividade (Brasil, 2003; ICH, 1996).

A linearidade e a faixa linear de trabalho foram determinadas a partir da avaliação de três curvas analíticas (preparadas em 3 dias consecutivos) obtidas com cinco concentrações cada (9, 12, 15, 18 e 21 µg/ml). Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir do estudo de linearidade do método. Considerou-se como limite mínimo de detecção, a concentração capaz de produzir resposta maior que três vezes o desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas analíticas. Para o limite de quantificação considerou-se a concentração capaz de produzir resposta maior que dez vezes o desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas analíticas (Brasil, 2003; ICH, 1996).

A exatidão foi avaliada pelo método de adição de padrão, no qual adicionou-se ao medicamento quantidades conhecidas (aproximadamente 10% da quantidade declarada) de padrão de referência de aciclovir. A precisão foi avaliada em condições de repetibilidade e de reprodutibilidade e expressa como o desvio padrão relativo (Brasil, 2003; ICH, 1996).

Peso Médio

Foram pesadas (balança Mettler Toledo AG 204), individualmente, 10 unidades de creme de aciclovir. Calculou-se o peso médio e os desvios individuais em relação a esse valor. Utilizaram-se as especificações descritas na farmacopéia brasileira (Farmacopéia Brasileira, 1988).

Limite de guanina

O limite de guanina presente nas amostras foi avaliado por cromatografia em camada delgada. Empregou-se celulose F₂₅₄ como fase estacionária. Pesou-se quantidade de creme equivalente a 30 mg de aciclovir, transferiu-se para tubo de centrifuga graduado, adicionou-se 3 ml de hidróxido de sódio 0,1 M e agitou-se para ocorrer a dispersão do creme. Após adição 5 ml de uma mistura de 1 volume de clorofórmio e 2 volumes de 1-propanol, a amostra foi misturada e centrifugada. Utilizou-se a camada

superior (solução 1). Transferiu-se 1 ml da solução 1 para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com hidróxido de sódio 0,1 M (solução 2). Foram preparados padrões de aciclovir a 0,6 mg/ml em hidróxido de sódio 1 M (solução 3) e de guanina a 0,06 mg/ml em hidróxido de sódio 0,1 M (solução 4).

Aplicou-se, separadamente, a placa 10 µl das soluções 1 a 4. Desenvolveu-se o cromatograma, inicialmente, utilizando como fase móvel acetato de etila. Removeu-se a placa, deixou-se secar ao ar. Novamente desenvolveu-se o cromatograma utilizando mistura de 1-propanol, hidróxido de amônio 13,5 M e sulfato de amônio a 5% (p/V) (10:30:60) como fase móvel. A placa foi removida e examinada sob luz ultravioleta (254 nm). Qualquer mancha secundária, correspondente à guanina, obtida no cromatograma com a solução 1 não deve ser mais intensa que aquela obtida no cromatograma com a solução 4 (Gil, 2007).

Identificação

A identificação do aciclovir presente nos medicamentos foi realizada por espectrofotometria de absorção no ultravioleta (Espectrofotômetro Thermo Evolution 100). O espectro da solução amostra a 0,0015% (p/V) é idêntico ao espectro da solução padrão preparado nas mesmas condições (Gil, 2007).

Contagem microbiana de bactérias e fungos

As contagens microbianas dos cremes de aciclovir foram realizadas pelo método de semeadura em profundidade. Empregou-se ágar de caseína-soja (TSA) para contagem de bactérias e ágar Sabourad dextrose para os fungos. As placas foram incubadas a 30-35°C por 4 dias para as bactérias e 20-25°C por 7 dias para os fungos. Após o período de incubação foram contadas as colônias presentes em cada uma das placas e calculou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por 1 g de amostra (Farmacopéia Brasileira, 1988; Pinto et al., 2003; USP, 2009).

Pesquisa de micro-organismos patógenos

As amostras de creme de aciclovir também foram avaliadas quanto à presença ou ausência de microrganismos patógenos. Foram pesquisados os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. Empregou-se metodologia e especificações descritas nas farmacopéias brasileira e americana (Farmacopéia Brasileira, 1988; Pinto et al., 2003; USP, 2009).

Doseamento de aciclovir por espectrofotometria de absorção no ultravioleta

Transferiu-se uma quantidade de creme equivalente a 7,5 mg de aciclovir para funil de separação com auxílio de 50 ml de ácido sulfúrico 0,5 M e agitou-se. Adicionou-se 50 ml de acetato de etila e, após agitação e separação das fases,

a fase aquosa foi coletada. Lavou-se a fase orgânica com 20 ml de ácido sulfúrico 0,5 M e fase aquosa foi combinada à anterior. Transferiram-se os combinados aquosos para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com ácido sulfúrico 0,5 M. Após homogeneização a solução foi filtrada, descartando os primeiros mililitros do filtrado. Transferiram-se 10 ml desta solução para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com água. Foi preparada solução padrão na mesma concentração, utilizando o mesmo solvente. Mediram-se as absorvâncias das soluções padrão e amostra em 255 nm (Espectrofotômetro Thermo Evolution 100), usando ácido sulfúrico 0,1 M para ajuste do zero. Calculou-se a quantidade de aciclovir a partir das leituras obtidas.

RESULTADOS

O método de doseamento por espectrofotometria de absorção no ultravioleta demonstrou-se específico / seletivo para a quantificação do aciclovir em creme. Apresentou linearidade adequada na faixa de concentração entre 9 e 21 µg/ml, com equação da reta $0,0111 + 55,5603X$ e $r^2 = 0,9979$ (Figura II). Os valores de limite de detecção e limite de quantificação obtidos foram de 0,3 µg/ml e 0,6 µg/ml, respectivamente. A recuperação obtida foi de 97,7% em relação à quantidade adicionada. A precisão em condições de repetibilidade foi de 0,5% e de reprodutibilidade foi de 2,3%.

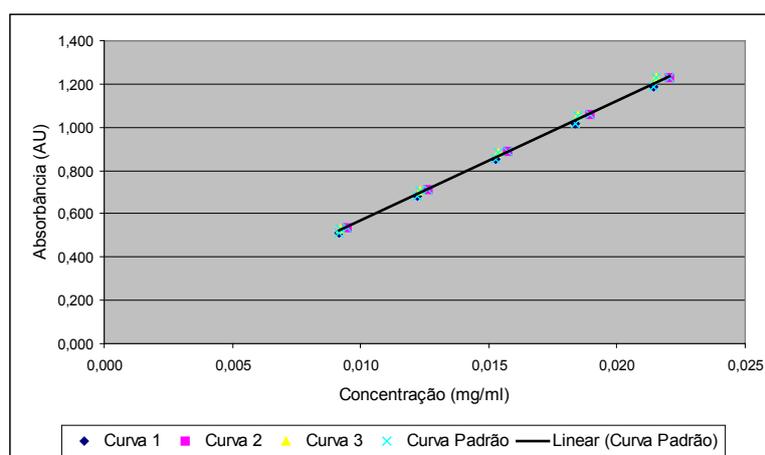


Figura II: Representação gráfica da curva padrão de aciclovir obtida pelo método de espectrofotometria de absorção no ultravioleta.

Os resultados encontrados para os testes de peso médio, limite de guanina por cromatografia em camada delgada, identificação por espectrofotometria de absorção no ultravioleta, contagem microbiana de bactérias e fungos, pesquisa de microrganismo patogênicos e doseamento por espectrofotometria de absorção no ultravioleta estão apresentados na tabela 1. Todos os medicamentos avaliados (de referência, genérico e similar) atenderam as especificações para os testes avaliados.

Tabela 1: Resultados dos cremes de aciclovir avaliados (medicamento de referência, genérico e similar).

Teste	Especificação	Medicamento de Referência	Medicamento Genérico	Medicamento Similar
Peso médio	LV ± 10%	10,3447 g/unid (-0,6% e 0,7%)	10,5634 g/unid (-1,0% e 0,7%)	10,3539 g/unid (-0,5% e 0,9%)
Limite de guanina	1%	Passa o teste	Passa o teste	Passa o teste
Identificação por espectrofotometria de absorção no ultravioleta	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Contagem microbiana de bactérias	< 1000 UFC/g	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
Contagem microbiana de fungos	< 100 UFC/g	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g
Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Pesquisa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Pesquisa de <i>Salmonella sp</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Doseamento por espectrofotometria de absorção no ultravioleta	90 a 110%VR	102,1% ^a (0,5% ^b)	104,8% ^a (0,7% ^b)	98,3% ^a (0,8% ^b)

VR: Valor rotulado

^a: média de três resultados independentes

^b: desvio padrão relativo

DISCUSSÃO

A especificidade/seletividade do método de doseamento por espectrofotometria de absorção no ultravioleta foi avaliada por meio da análise de amostras preparadas em condições de estresse (hidrólise ácida,

hidrólise alcalina, oxidação e aquecimento). Os resultados das amostras preparadas em condições de estresse demonstraram que o método avaliado é capaz de determinar a quantidade de aciclovir em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (Brasil, 2003 e ICH, 1996).

Na literatura são descritos métodos para análise de aciclovir por espectrofotometria derivativa (Mahrous et al., 1992, Daabees, 1998). Estes métodos destacam-se por apresentarem maior exatidão em relação ao método por espectrofotometria clássica, entretanto o trabalho analítico é consideravelmente maior. O método clássico proposto neste trabalho apresenta exatidão satisfatória para o uso pretendido. A presença de guanina (principal impureza do aciclovir) pode interferir na quantificação do aciclovir por espectrofotometria de absorção no ultravioleta (Daabees, 1998). Entretanto, o teste limite de guanina por cromatografia em camada delgada permite garantir que a quantidade desta impureza (máximo 1%) não interferirá no desempenho do método.

As absorvâncias determinadas foram diretamente proporcionais às concentrações das soluções-padrão no intervalo correspondente a 60% e 140% da concentração teórica (15 µg/ml), apresentando ajuste ao modelo de regressão linear e coeficiente de regressão (r^2) superior a 0,98 (Brasil, 2003 e ICH, 1996). Os resultados de exatidão (recuperação = 97,7%) e precisão (repetibilidade = 0,5% e reprodutibilidade = 2,3%) estão de acordo com o preconizado em guias nacionais (Brasil, 2003) e internacionais (ICH, 1996).

O método proposto para doseamento de aciclovir em creme por espectrofotometria de absorção no ultravioleta foi validado, mostrando especificidade/seletividade, linearidade e faixa linear, limite de detecção/quantificação, exatidão e precisão adequados para o uso pretendido.

Os medicamentos avaliados atendem as especificações para os testes de peso médio, limite de guanina por cromatografia em camada delgada, identificação por espectrofotometria de absorção no ultravioleta, contagem microbiana de bactérias e fungos, pesquisa de microrganismo patogênicos e doseamento por espectrofotometria de absorção no ultravioleta. Portanto, os três medicamentos (de referência, genérico e similar) podem ser considerados equivalentes farmacêuticos.

ABSTRACT

Validation of acyclovir assay method and its use to verify pharmaceutical equivalence of creams containing acyclovir

The aim of this study was to validate a UV absorption spectrophotometric method to assay acyclovir in cream and to use it to verify the pharmaceutical equivalence of the original brand-name, generic and similar (brand) medicines. The method proposed for acyclovir cream was validated, showing adequate specificity/selectivity, linearity and linear range, detection and quantitation limits, accuracy and precision. The medicines were tested for average weight, guanine contents within limits (by thin-layer chromatography), drug identity (by UV spectrophotometry), bacterial and fungal counts and presence of pathogens, and were assayed by UV spectrophotometry. All medicines met the requirements in all these tests and can, therefore, be considered equivalent.

Keywords: Aciclovir. Method validation. Pharmaceutical equivalence.

REFERÊNCIAS

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 16, de 02 de março de 2007. Aprova o regulamento técnico para medicamentos genéricos. [citado 07 jul. 2009]. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=25960&word=>

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE n. 310, de 01 de setembro de 2004. Determina a publicação do "Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução". [citado 07 jul. 2009]. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15466&word=>

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". [citado 07 jul. 2009]. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>

British Pharmacopeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 2008, p. 2392.

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2006, p. 1821.

Daabees HG. The use of derivative spectrophotometry for the determination of acyclovir and diloxanide furoate in presence of impurity or degradation product. *Anal Lett.* 1998; 31(9):1509.

Farmacopéia Brasileira, 4 ed. São Paulo: Atheneu; 1988. pt 1.

Gil ES. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos, São Paulo: Pharmabooks; 2007. p. 485.

International Conference on Harmonisation (ICH). Commission of the European Communities. Validation of analytical procedures: text and methodology ch2 (R1). Geneva: ICH; 1996.

Mahrous MS, Abdel-Khalek MM, Daabees HG, Beltagy A. Use of Differential Spectrophotometry for Determination of Cytarabine and Acyclovir in Their Dosage Forms. *Anal Lett.* 1992; 25(8):1491-501.

Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 325.

United States pharmacopeia, 32nd. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2009. p. 1430.