

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS TOLEDO
ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISE INSTRUMENTAL

SANDRA CRISTINA GIROTTI PINTO

**DETERMINAÇÃO DE ACICLOVIR EM PLASMA HUMANO ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO
DE PROTEÍNAS POR UHPLC-ESI-MS/MS: DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E
APLICAÇÃO EM ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA**

MONOGRAFIA DE ESPECIALIZAÇÃO

TOLEDO
2019

SANDRA CRISTINA GIROTTI PINTO

**DETERMINAÇÃO DE ACICLOVIR EM PLASMA HUMANO ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO
DE PROTEÍNAS POR UHPLC-ESI-MS/MS: DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E
APLICAÇÃO EM ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA**

Monografia de Especialização, apresentada ao Curso de Especialização em Análise Instrumental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo, como requisito parcial à obtenção do título de Especialista em Análise Instrumental.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Ferreira da Rosa
Coorientador: Dr. Wagner Alex Jann Favreto

TOLEDO
2019

TERMO DE APROVAÇÃO

DETERMINAÇÃO DE ACICLOVIR EM PLASMA HUMANO ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS POR UHPLC-ESI-MS/MS: DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO EM ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA

Por

SANDRA CRISTINA GIROTTO PINTO

Esse trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia 07 de Junho de dois mil e dezenove, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Análise Instrumental, no Curso de Especialização em Análise Instrumental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo. *A candidata foi arguida* pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo relacionados.

Após deliberação, a banca Examinadora considerou o ***trabalho Aprovado***.

Prof. Dr. Mauricio Ferreira da Rosa
(Orientador)

Dr. Wagner Alex Jann Favreto
(Coorientador)

Prof. Dr. Thiago Cintra Maniglia
(Membro – Universidade Tecnológica Federal do Paraná)

Prof. Dr. Lincoln Figueira Marins Coutinho
(Membro – Prati-Donaduzzi)

****A versão assinada encontra-se arquivada na Coordenação da Especialização***

RESUMO

Foi desenvolvido e validado um método de espectrometria de massa em tandem com fonte de ionização de electrospray acoplado a cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC-ESI-MS/MS) para quantificação de aciclovir em plasma. Extração por precipitação de proteína foi proposta para a clean-up da amostra em plasma usando entecavir como padrão interno (PI). As análises foram realizadas em coluna C₁₈, fase móvel de 0,1% de ácido fórmico: metanol + 0,1% de ácido fórmico em modo de eluição gradiente. O espectrômetro de massas equipado com fonte de íons de electrospray em modo positivo, utilizando o modo de operação de monitoramento de reação múltipla (MRM), para detectar íon precursor → íon produto com 226 > 152 m/z e 278 > 152 m/z transições, para analito e PI, respectivamente. A linearidade foi verificada entre 4 a 1000 ng/mL para o aciclovir, com R² = 0,998333. Seletividade satisfatória, linearidade, precisão, exatidão e ausência de efeito matricial ou carryover (Efeito Residual) foram avaliados pelo método UHPLC-ESI-MS/MS. O método proposto foi aplicado com sucesso em um estudo de bioequivalência em voluntários humanos saudáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Aciclovir, bioequivalência, plasma humano, precipitação de proteínas, LC-MS/MS.

ABSTRACT

A sensitive ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS) method for measurements of acyclovir in plasma was developed and validated. A protein precipitation extraction was proposed for the clean up of plasma and entecavir was added as internal standard (IS). The analyses were carried out using a C₁₈ column and mobile phase of 0.1% formic acid:methanol + 0.1% formic acid in gradient mode of proportion. The mass spectrometer equipped with an electrospray ion source in positive mode, was set up in selective reaction monitoring, to detect precursor → product ion with 226 > 152 m/z and 278 > 152 m/z transitions, for analyte and IS, respectively. The linearity was checked between 4 to 1000 ng/mL for acyclovir, with R²=0.998333. Satisfactory selectivity, linearity, precision, accuracy and showed no matrix effect or carryover were obtained for the UPLC-ESI-MS/MS method. The proposed method was successfully applied to a bioequivalence study of healthy human volunteers.

KEYWORDS: Acyclovir, bioequivalence, human plasma, protein precipitation, LC-MS/MS.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
PROCEDIMENTO.....	10
Produtos químicos e reagentes	10
Aparatos e condições analíticas	10
Preparação das soluções estoque, curva de calibração e amostras de controle de qualidade.....	11
Procedimento de extração do plasma	11
Validação do método bioanalítico.....	12
Seletividade e cross-talk.....	12
Efeito de Matriz	12
Carryover.....	13
Curva de Calibração.....	13
Recuperação	14
Precisão e Exatidão.....	14
Estabilidade no plasma	14
Estabilidade da solução estoque solução de trabalho.....	15
Estudo de bioequivalência.....	15
Análise estatística e parâmetros farmacocinéticos.....	16
RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
Desenvolvimento do Método	17
Seleção do PI.....	17
Otimização da técnica de extração	17
Otimização do UHPLC	17
Otimização MS/MS.....	18
Validação Bioanalítica	19
Aplicação do método bioanalítico e análise estatística e parâmetros farmacocinéticos.....	20
CONCLUSÃO	21

INTRODUÇÃO

O aciclovir (9 - [(2-hidroxietoxi) metil] -9H-guanina) é um análogo acíclico do nucleosídeo guanina, que não possui um 3-hidroxila na cadeia lateral. De fórmula molecular $C_8H_{11}N_5O_3$, massa molar de 225,2043 g / mol, conforme demonstrado na Figura 1B, possui dois grupos ionizáveis, pois é um fármaco de natureza hidrofílica e anfotérica. A porção básica de pKa 2,63 refere-se a desprotonação do anel de imidazólico, enquanto a porção ácida, de pKa 7,99 refere-se ao oxigênio ligado ao anel pirimídínico (1-2). Ligeiramente solúvel em água, facilmente solúvel em dimetilsulfóxido e muito pouco solúvel em etanol. Solúvel em soluções diluídas de ácidos minerais e hidróxidos alcalinos (3).

O aciclovir é um agente antiherpes vírus que geralmente é bem tolerado, causando efeitos adversos leves, sendo comercializado na forma de cápsula, pomada e pó para reconstituição intravenosa. Sua administração oral é baixa, porém é amplamente distribuída no organismo e, principalmente no Líquido Cefalorraquidiano (LCR) (4-5).

Quando administrado topicamente, pode causar irritação da mucosa e queimação transitória, quando usado em base de polietilenoglicol. Por via oral, raramente tem sido associado a náusea, diarreia ou cefaleia, e muito raramente à insuficiência renal e neuropatia (4). Por via intravenosa os efeitos geralmente ocorrem no local da aplicação, ocorrendo inflamação (5).

É um nucleosídeo sintético, análogo à purina, com atividade inibitória *in vitro* e *in vivo* contra os vírus da família herpesvírus (6). As infecções causadas por herpesvírus são divididas em dois tipos, sendo o tipo 1 tipicamente causado na boca, face, pele, esôfago ou cérebro. Já a tipo 2, geralmente ocorre na genitália, no reto, na pele, nas mãos ou meninges. Em ambos os casos, as infecções podem ser primárias ou resultar de uma infecção latente (4).

Os parâmetros farmacocinéticos de aciclovir após administração oral são variáveis; o composto tem biodisponibilidade limitada devido ao seu elevado metabolismo de primeira passagem. A concentração máxima do fármaco ocorre aproximadamente $1,6 \pm 0,7$ h após a administração oral (4, 5). Os níveis de concentração plasmática com um DPR de 43,5% para uma dose de 200 mg (7-8) .

Para a quantificação do aciclovir no plasma humano, são utilizadas diferentes técnicas para extração do analito. Métodos cromatográficos tem sido relatado para a determinação de aciclovir em plasma humano, especialmente cromatografia líquida (LC) (9).

Em métodos bioanalíticos, o uso de cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC) é mais comumente utilizado devido ser um novo avanço em cromatografia líquida rápida, sensível e de alta resolução, aumentando significativamente a eficiência da separação cromatográfica através do uso de colunas com partículas de menor diâmetro (1,8 µm) e resistindo a pressões mais elevadas em comparação com os materiais de embalagem convencionais (10).

Quando acoplado à espectrometria de massa, (UHPLC-MS/MS), permite a quantificação seletiva e sensível de fármacos estruturalmente não relacionados em uma única corrida analítica, resultando em reduções substanciais no tempo analítico, tempo de resposta e custos (11).

Há relatos de extração do aciclovir do plasma pela técnica da SPE. No entanto, Swart et al. (1994) apresentaram um procedimento totalmente automatizado para a determinação de aciclovir no plasma utilizando extração em fase sólida e detecção por HPLC-UV (12). Poirier et al. (1999) descreveram um método de cromatografia líquida para a determinação de aciclovir no plasma utilizando um sorvente polimérico de fase reversa para extração em fase sólida, após a eluição do fármaco do cartucho com a fase móvel (13). Além disso, a extração em fase sólida tem sido amplamente utilizada para produzir amostras livres de impurezas e com ótima recuperação do ativo (14-15). Um método de HPLC foi desenvolvido por Fernandez, et al (2003) para a determinação de aciclovir em plasma utilizando 5'-N-metilcarboxiamidoadenosina como padrão interno, as quais foram purificados usando extração em fase sólida (14). Patel *et al.* (2015) detectaram aciclovir por espectrometria de massa em tandem, operando no monitoramento do modo de aquisição de íons positivos e reações múltiplas (MRM), usando aciclovir-d4 como padrão interno e extração em fase sólida (16). Mårtson et al. (2018) desenvolveram e validaram um método bioanalítico usando LC-MS / MS para a medição de ganciclovir e aciclovir usando padrões deuterados baseados nas diretrizes da EMA e FDA (17).

McMullin, *et al.* (1996) publicaram o desenvolvimento de um simples e isocrático método de absorvância por HPLC-UV para aciclovir e ganciclovir usando 1% de ácido ortofosfórico contendo 10 g octanol / L de ácido sulfônico na fase móvel (18). Em estudos publicados por Bangaru *et al.* (2000), Zendelovska *et al.* (2015), o aciclovir inalterado foi analisado por HPLC, através da análise de precipitação de proteína do plasma humano pela adição de ácido perclórico (19-20). Zeng *et al.* (2008) validaram um método de fluorescência por HPLC para a quantificação de aciclovir em plasma humano, adicionado como padrão interno guanosina, extraído por precipitação de proteínas com ácido perclórico a 7% (21). Teshima *et al.* (2003) publicaram um método desenvolvido por cromatografia de

fase reversa com detecção espectrofotométrica a 254 nm para a determinação simultânea de aciclovir e ganciclovir em plasma humano, posteriormente obtida por precipitação de proteínas (22). Martson *et al* (2018) usam o metanol como agente precipitante para quantificar o aciclovir e outros compostos análogos por LC-MS/MS (17).

No estudo publicado por Bahrami *et al.* (2005), o aciclovir foi extraído por extração líquido-líquido usando vanilina como padrão interno e diclorometano e álcool isopropílico (1: 1, v / v) como solvente de extração (23). Shao *et al.* (2012), quantificaram o aciclovir utilizando cromatografia líquida de ultra alta performance - ionização por electospray por aquecimento - espectrometria de massa em tandem (UHPLC-ESI-MS/MS) (24).

Em um contexto geral, a metodologia mais utilizada para a avaliação de fármacos em matrizes biológicas é a cromatografia acoplada a espectrometria de massas (25). A técnica tem sido amplamente utilizada em estudos para a análise de compostos alvo e ativos de interesse (26). Nos últimos 10 anos é a técnica que mais tem sido usada (10, 16-17, 24-25)

O limite inferior de quantificação (LIQ) abaixo de 10 ng/mL foi relatado apenas após o uso da técnica analítica LC-MS/MS para a quantificação de aciclovir no plasma humano, de acordo com a tabela 1. Metodologias usando HPLC-UV ou RF somente reportaram o uso de LIQ até 10 ng/mL (9, 12, 23). O método proposto neste artigo possui uma técnica de extração rápida, muito mais simples que as demais, com uso de baixo volume de amostras e solventes, bem como o uso de reagentes menos tóxicos, como água e com LIQ a 4 ng / mL. .

O objetivo deste trabalho foi validar um simples, linear, seletivo e sensível, preciso, exato e reprodutível método por UHPLC-ESI-MS/MS para determinação de aciclovir no plasma humano. A técnica de extração por precipitação de proteínas extremamente rápida consistiu na precipitação precedida por agitação e centrifugação, e então transferência de volume do sobrenadante, diluição e homogeneização. O método também se mostrou aplicável à determinação do aciclovir no estudo de bioequivalência.

PROCEDIMENTO

Produtos químicos e reagentes

- (a) Acetonitrila (C₂H₃N), grau HPLC (Merck, Darmstadt, Germany), lote: I820430608.
- (b) Anticoagulante, tubos Vacutainer® com heparina sódica (Becton & Dicskson, New Jersey, NJ, USA).
- (c) Ácido Fórmico (CH₂O₂), ACS for Analysis (Sharlau, Barcelona, Spain), lote: 14689802.
- (d) Metanol (CH₃OH), grau HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), batch: SHBG9607V.
- (e) Padrão de Referência Aciclovir 100% (Farmacopeia Brasileira), batch: 1021, ver Figura 1A.
- (f) Padrão Interno Entecavir monohidratado 93,7% (United States Pharmacopeia), lote: R05700, ver Figura 1B.
- (g) Água (H₂O), obtida do sistema Milli-Q Elix (Millipore, Bedford, MA, USA), lote: diário.

Aparatos e condições analíticas

O sistema UHPLC utilizado foi Waters Acquity H-Class FTN (Milford, MA, USA). Os experimentos foram realizados usando uma coluna de fase reversa Kinetex Phenomenex (Torrance, Califórnia, USA) C₁₈ (100 X 4.6 mm i.d.; 2.6 µm, Part Number: 00D-4462-E0). Gradiente de eluição usando 0.8 mL/min de fluxo (Tabela 2). Fase Móvel constituída de duas soluções, solução A: 0.1% ácido fórmico e solução B: metanol + 0.1% ácido fórmico. A fase móvel foi sonicada por 5 minutos sob vácuo. A temperatura do amostrador foi configurada em 10°C, temperatura da coluna em 40°C e o volume de injeção em 6 µL.

O analito e o padrão interno (PI) foram detectados em um espectrômetro de massas (Xevo TQ-S Atmospheric Pressure Ionization, Waters, Milford, MA, USA) equipado com fonte de íons eletrospray, operando no modo de íon positivo. O software MassLynx versão 4.1 foi usado para controlar todos os parâmetros do LC e MS/MS. A quantificação do estudo foi realizada utilizando modo de monitoramento de reação múltipla (MRM), transições de íon precursor --> íon produto para aciclovir (m/z 226-152) e para entecavir (m/z 278-152). Parâmetros otimizados para fonte de ionização foram: gas 1 (gas nebulizador) 150 L/h, gas 2 (gas de aquecimento)800 L/h, voltagem capilar 2.4 kv, temperatura 500°C. Demais parâmetros dos compostos dependentes do MS foram: voltagem do cone 20 eV (Aciclovir) e 20 eV (Entecavir), energia de colisão 12 eV (Aciclovir) e 12 eV

(Entecavir). O gás argônio foi usado para dissociação de colisão induzida com pressão de 4 mbar e a célula eletromultiplicadora foi programada em 525 eV com ganho de 1.0. O MS foi mantido em resolução de massa unitária com tempo de leitura entre as transições de massa em 0.4 s.

Preparação das soluções estoque, curva de calibração e amostras de controle de qualidade

As soluções estoque de aciclovir e padrão interno foram preparadas dissolvendo quantidade pesadas com exatidão em metanol com uma concentração final de 200 µg/mL respectivamente. A solução padrão estoque de aciclovir foi diluída com metanol para obter uma série de soluções de trabalho de 200 - 50000 ng/mL. Todas as soluções foram armazenadas a -20°C e foram deixadas à temperatura ambiente antes de serem utilizadas. O entecavir foi diluído com metanol para obter uma solução de trabalho com concentração de 200 ng/mL (esta solução foi preparada diariamente).

O sangue humano de voluntários saudáveis e livres de drogas, foi coletado em tubos vacutainer com heparina. Após centrifugação, o plasma branco foi recolhido e armazenado a -20°C até ser utilizado. Os padrões de calibração e as amostras de Controle de Qualidade (CQ) foram preparados fortificando plasma branco com solução de trabalho. Os padrões de calibração foram de 4, 20, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 ng/mL para aciclovir. As amostras do Controle de Qualidade foram preparadas com pool de plasma nas concentrações de 4 (LIQ), 12 (baixa), 375 (média), 750 ng / mL (alta) e 1200 (diluição) para aciclovir. Eles foram divididos em alíquotas que foram armazenadas a -20°C até a análise.

Procedimento de extração do plasma

O aciclovir e o PI foram extraídos do plasma humano através da técnica de precipitação de proteínas. Todas as amostras de plasma humano congelado foram descongeladas à temperatura ambiente. Para realizar a extração, foi adicionado 0,1 mL da amostra (plasma humano) ao tubo eppendorf, 50 µL da solução padrão de entecavir a 200 ng / mL (dilúente: metanol) e 350 µL de metanol. A extração foi realizada em vórtex por 3 min e centrifugação por 7 minutos / 14.000 rpm / 4°C. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo eppendorf e foram diluídos em 400 µL de água ultrapura e misturados em vórtex por 2 min. O sobrenadante foi transferido para vials e uma alíquota de 6 µL foi injetada no sistema UHPLC-ESI-MS/MS.

Validação do método bioanalítico

O método foi validado através dos seguintes parâmetros: efeito de matriz, seletividade, carryover, linearidade, faixa, recuperação, exatidão, precisão, limite inferior de quantificação (LIQ) e estudo de estabilidade segundo FDA e ANVISA (29-30).

Seletividade e cross-talk

A seletividade do método foi avaliada através da análise de quatro amostras branco normais, uma hiperlipêmica e uma hemolizada de plasma humano obtidas de seis indivíduos, e os resultados foram comparados com aqueles obtidos de uma amostra extraída contendo a concentração de LIQ desejada (4 ng/mL) sem adição de PI e uma amostra com PI sem analito. O cross-talk foi avaliado com uma amostra branca extraída adicionada com PI e uma amostra LSQ sem adição de padrão interno.

Além disso, foram determinadas as interferências potenciais das drogas comuns, especialmente para medicamentos que poderiam ser administrados concomitantemente durante a execução da fase clínica. Uma amostra branco foi contaminada com um pool dos seguintes medicamentos: acetaminofeno, ibuprofeno, cafeína, butilbrometo de escopolamina, ondansetrona, metoclopramida e dipirona.

Efeito de Matriz

Matuszewski *et al.* (1998) relataram que os componentes da matriz que coeluem com os analitos podem afetar adversamente a reprodutibilidade da ionização do analito na fonte ESI de um espectrômetro de massas (31). A resposta da área média dos picos das seis diferentes fontes de amostras foi comparada com as de soluções padrão com concentrações de controle de qualidade inferior (LQC) e controle de qualidade superior (HQC), assumindo DPR de 15% entre amostras para um efeito de matriz controlado. Os mesmos fármacos concomitantes avaliados na seletividade também foram avaliados no efeito matriz.

Carryover

O carryover (efeito memória) é o aumento do sinal do analito ou padrão interno causado pela contaminação do equipamento ou seus componentes por amostras previamente analisadas. Para avaliar o parâmetro foram utilizadas 3 (três) injeções da mesma amostra branca, uma antes e outra após a injeção de uma amostra processada do LSQ. Os resultados foram comparados com a resposta cromatográfica obtida de uma amostra processada de LIQ. O critério de aceitação adotado foi: a resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta do analito nas amostras de LIQ processada. As respostas máximas de interferência no tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% (cinco por cento) da resposta do PI.

Curva de Calibração

Foi utilizada a curva de calibração (amostra de plasma sem analito ou amostra em branco), amostra zero (amostra de plasma processada com PI) e oito concentrações incluindo o LIQ, variando de 4 a 1000 ng/mL para Aciclovir. Uma amostra branco (processada sem PI) e uma amostra zero (amostra de matriz processada com PI) foi usada para avaliar a possibilidade de contaminação das amostras.

A razão entre a área do pico do fármaco e o PI em relação às respectivas concentrações do padrão foi utilizada para construir o gráfico e a linearidade avaliada por uma análise de regressão ponderada por mínimos quadrados ($1/x^2$). Esta regressão linear foi utilizada devido ao ajuste da curva, bem como, para aumentar a precisão dos níveis de baixa concentração. A análise de regressão linear do aciclovir foi realizada plotando a razão da área do pico (y) contra o inverso da concentração quadrática do analito ($1/x^2$) em ng/mL; A regressão do peso a $1/x^2$ foi aplicada após avaliação da heterocedasticidade através da avaliação dos resíduos (desvios) com e sem ponderação de acordo com a metodologia descrita por Almeida *et al.* (32).

Os critérios de aceitação para cada concentração padrão calculada não foram mais do que 15% de desvio do valor nominal, exceto para o LIQ que foi estabelecido em 20%.

Recuperação

Para eficiência de extração (recuperação), comparamos amostras de CQ antes e depois da extração em 6 amostras replicadas. Antes e depois da extração, três concentrações diferentes de aciclovir (12, 375, 750 ng/mL) foram adicionadas ao plasma branco. Os resultados foram determinados comparando as áreas dos picos do analito (equação 1).

$$\text{Recuperação\%} = (\text{média extraída} / \text{média não extraída}) * 100 \text{ (Equação 1)}$$

Precisão e Exatidão

A precisão intra-dia e inter-dias do método foram avaliadas em sextuplicata (6 réplicas), análise de cinco amostras CQ (baixa, média, diluição e alta) e a amostra LOQ. Os padrões de calibração e os controles de qualidade foram analisados em três diferentes lotes para determinar a precisão e exatidão intralotes e interlotes. A avaliação da precisão baseou-se nos critérios (17) de que o desvio de cada nível de concentração deve estar dentro de $\pm 15\%$, com exceção do LOQ, que deve estar dentro de $\pm 20\%$. Da mesma forma, para a precisão, o valor médio não deve desviar-se em $\pm 15\%$ da concentração nominal, exceto o LLOQ, onde não deve desviar-se em $\pm 20\%$ da concentração nominal.

Estabilidade no plasma

A estabilidade de aciclovir no plasma humano foi estudada usando dois padrões CQ em baixa (12 ng/mL) e alta (750 ng/mL) concentração analisadas em seis réplicas. As amostras de estabilidade foram calculadas com base em uma curva de calibração recém preparada. A estabilidade foi comprovada quando não foi observado desvio superior a 15% das concentrações médias obtidas em relação ao valor nominal (exceto para a estabilidade tempo zero onde apenas é permitido desvio de 10%). O tempo zero de estabilidade foi determinado antes de se prosseguir com o estudo de estabilidade para verificar a integridade das amostras antes de serem submetidas ao estresse.

A estabilidade longa duração foi determinada testando amostras CQ de plasma após armazenamento a -20°C durante 170 dias. A estabilidade curta duração foi avaliada através da análise de amostras CQ de plasma mantidas à temperatura ambiente por 6 h, o que excedeu o tempo de preparação de rotina das amostras. A estabilidade do congelamento e descongelamento foi investigada após quatro ciclos de degelo (temperatura ambiente) e de congelamento (-20°C). A estabilidade de

preparo foi avaliada através da análise das amostras CQ de plasma extraídas mantidas no amostrador automático a 10°C durante 47 horas.

Estabilidade da solução estoque solução de trabalho

A estabilidade das soluções estoque de Aciclovir e PI (maior concentração) e soluções de trabalho (menor concentração) foram avaliadas pela comparação dos resultados de uma solução mantida por cerca de 13 dias a -20°C e de uma solução recém preparada. A estabilidade das soluções estoque de aciclovir e PI mantidas 5 h em um rack à temperatura ambiente na presença de luz ambiente também foi testada. Para este propósito, três repetições de cada solução submetida a estresse foram diluídas em água e injetadas no sistema UPLC-ESI-MS/MS. Os resultados foram comparados com os obtidos a partir de soluções recém preparadas em concentrações correspondentes. As amostras qualificaram se o desvio do teste estava dentro de $\pm 10\%$. Nota: as soluções foram diluídas e analisadas dentro da faixa de linearidade do detector (solução estoque 1:3999 v/v) e (solução de trabalho 1:249 v/v).

Estudo de bioequivalência

Quarenta e oito voluntários saudáveis (n: 48), 24 homens e 24 mulheres, com idade entre 18 e 50 anos (média \pm DP, 33,0 \pm 8,5 anos), em peso de 48,5 a 97,0 kg (média \pm DP, 69,1 \pm 11,5 kg), altura de 1,50 a 1,85 m (média \pm DP, 1,67 \pm 0,09 m) e Índice de Massa Corporal (IMC) de 19,1 a 28,7 (média \pm DP, 24,5 \pm 2,6 m) e dentro de 15% do peso corpo ideal, foram inscritos. O protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética local e os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participar do estudo. Os voluntários eram saudáveis e não apresentavam história de doenças cardíacas, renais, neurológicas ou metabólicas, sem história de hipersensibilidade a medicamentos, não estavam em tratamento farmacológico e as voluntárias não estavam grávidas. O estudo foi um estudo aberto, randomizado, cruzado de dois períodos e dois grupos com um intervalo de washout de 1 semana. Durante o primeiro período, os voluntários do grupo A receberam 1 comprimidos com uma dose de 200 mg de Zovirax® (produto de referência), enquanto os voluntários do grupo B receberam 1 comprimido com 200 mg de Aciclovir (produto testado), ambas formulações são comprimidos revestidos. Durante o segundo período, o procedimento foi repetido nos grupos em sentido inverso. Os comprimidos foram administrados aos voluntários de manhã, após um jejum

noturno, com 200 mL de água. Os voluntários receberam almoço e lanche da tarde, respectivamente, 5 e 8 horas após a administração do medicamento. Os voluntários não ingeriram qualquer bebida alcoólica, café ou outras bebidas contendo xantina durante a triagem. Além disso, não tomaram nenhum outro medicamento, uma semana antes do estudo e durante sua execução. Amostras de sangue foram coletadas às 0:00 (pré-dose); 0:20; 0:40; 1:00; 1:20; 1:40; 2:00; 2:20; 2:40; 3:00; 3:30; 4:00; 5:00; 6:00; 8:00; 10:00; 12:00; 16:00 horas após a dosagem. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 3500 rpm e 4°C e o plasma separado e armazenado a -20°C até a extração e quantificação do aciclovir.

Análise estatística e parâmetros farmacocinéticos

As curvas de concentrações plasmáticas individuais foram construídas e os valores de $C_{\text{máx}}$ e $T_{\text{máx}}$ foram obtidos diretamente dessas curvas, e a área sob a curva de concentração plasmática da linha de base até a última concentração mensurável (AUC_{0-t}) foi calculada por um método não-compartimental, usando a regra trapezoidal linear (33). A partir da fase terminal de decaimento logarítmico, a constante de taxa de eliminação (k_e) foi estimada usando regressão linear, e o $t_{1/2}$ foi estimado usando a seguinte equação 2:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_e, \text{ onde } \ln \text{ foi definido como o logaritmo natural (Equação 2).}$$

A extrapolação da AUC da linha de base para o infinito ($AUC_{0-\infty}$) foi calculada da seguinte forma, na equação 3, em que C_t foi a última concentração plasmática mensurável.

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t / k_e \text{ (Equação 3)}$$

Para avaliar a bioequivalência entre as formulações de teste e de referência, a $C_{\text{máx}}$, a AUC_{0-16h} e a $AUC_{0-\infty}$ foram consideradas como as variáveis primárias. Utilizando dados transformados em log para estes parâmetros, a ANOVA para um desenho de cruzamento 2 x 2, foi realizada ao nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

Os intervalos de confiança de 90% (IC) das razões médias geométricas (teste / referência) da $C_{\text{máx}}$, AUC_{0-16h} e $AUC_{0-\infty}$ foram calculados usando dados transformados em log. O teste e as formulações referência foram considerados bioequivalentes se os 90% IC desses parâmetros estivessem dentro de uma faixa predeterminada de 80% a 125%. Todas as análises farmacocinéticas e estatísticas foram realizadas utilizando WinNonlin Versão 5.0.1 (Pharsight, Mountain View, Califórnia) e Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento do Método

Seleção do PI:

O melhor PI, em um ensaio por LC-MS/MS, é uma forma deuterada do analito. No entanto, devido ao alto custo ou disponibilidade, outras alternativas são frequentemente procuradas. Desta forma, uma molécula análoga ao analito foi selecionada. O padrão interno entecavir foi selecionado, pois apresenta semelhanças estruturais e propriedades físico-químicas, como por exemplo: solubilidade, coeficiente de participação e ionização conforme a tabela 3.

Otimização da técnica de extração

Na extração líquido-líquido foram utilizados diferentes tipos de solventes orgânicos e misturas de solventes, como acetato de etila, éter etílico, diclorometano, clorofórmio, éter metil terc-butílico e hexano, resultando em diferentes polaridades para as fases do extrator, mas sem sucesso.

Metanol e acetonitrila foram testadas como agentes precipitantes. A precipitação de proteínas utilizando metanol, com posterior diluição da primeira etapa de extração em água, diluente em que o analito e PI são solúveis, foram suficientes para extrair aciclovir e PI do plasma, obtendo-se ótimo desempenho para a limpeza da amostra.

Otimização do UHPLC

Foi utilizada coluna de fase estacionária C₁₈, por disponibilidade e recomendação técnica para análise de compostos polares, moderadamente polares e não-polares, ácidos e bases ionizados, e compostos que diferem em hidrofobicidade. Como a espectrometria de massa não é possível adicionar aditivos químicos, como tampões, sais ou reagentes não voláteis, para correção da forma de pico, a escolha de uma coluna adequada foi essencial para alcançar a sensibilidade necessária.

A coluna com tamanho de partícula intermediário foi usada em um sistema HPLC ou UHPLC de baixo volume morto, colunas Kinetex de 2,6 µm têm desempenho similar a colunas sub-2 µm totalmente porosas, que triplica a eficiência de uma coluna de 5 µm e uma

de 3 μm (coluna totalmente porosa). Uma das principais vantagens é a considerável solução flexível para aumentar a resolução, reduzir os tempos de análise e diminuir o uso de solvente nos métodos HPLC e UHPLC.

O requisito primário para um composto ser detectado por espectrometria de massa é ser ionizado. Como o analito e o padrão interno possuem $pK_a \sim 8$, com propriedades básicas, o ácido fórmico foi utilizado como aditivo na fase móvel. O ácido fórmico tem pK_a 3.5, assegurando que aproximadamente 100% do analito e PI estejam ionizados na própria fase móvel.

O principal desafio cromatográfico foi encontrar uma relação na proporção de fase móvel e fluxo móvel que promoveria a separação dos analitos contra os constituintes da matriz para evitar uma forte supressão iônica da resposta cromatográfica dos analitos analisados. Após a eluição dos analitos, foi necessário incluir um gradiente rápido na proporção de fase móvel, com objetivo principal de eliminar os constituintes da matriz que foram fortemente retidos na coluna e que possam interferir na análise de amostras posteriores.

O acoplamento de UHPLC com detecção MS/MS mostrou alta seletividade, pois somente os íons derivados dos analitos de interesse foram monitorados, e a comparação dos cromatogramas do plasma humano branco e contaminado indicou que não foram detectadas interferências de substâncias endógenas na Figura 2A, ou interferência do padrão interno na transição de massa do analito na Figura 2B. Cromatogramas típicos obtidos a partir do método UHPLC-MS/MS proposto, com a resolução do pico simétrico correspondente ao Aciclovir e PI são mostrados na Figura 2B. Os tempos médios de retenção de Aciclovir e PI, 1,92 e 2,77 min (Figura 2C), respectivamente, permitem uma rápida determinação dos analitos, o que é uma vantagem importante para a análise de rotina em nível de traços.

Otimização MS/MS

A fim de detectar aciclovir e entecavir (PI) usando MRM, espectro de massa de varredura completa e espectro de massa de íons precursores (Espectro MS) e íons produtos (Espectro MS/MS) de cada composto foram investigados. Sob as condições espectrométricas de massa, descritas acima, os íons moleculares protonados, $[M + H]^+$, foram os íons mais abundantes para aciclovir e entecavir (PI) observados em m/z 226 e 278,

respectivamente, em sua varredura completa no espectro MS. Não foi verificada a presença de formação de íons adutos. Parâmetros como temperatura de dessolvatação, temperatura da fonte ESI, tensão capilar e cone, vazões de gás de dessolvatação e gás do cone foram otimizados para obter a maior intensidade da molécula protonada do analito. Os espectros MS/MS obtidos em modo Daughter SCAN mostraram íons fragmentos de alta abundância em m/z 152 e 152 para aciclovir e entecavir, respectivamente. Os espectros MS/MS, ou seja, o perfil de fragmentação destes compostos são mostrados na Figura 3 A-B, bem como a fragmentação proposta para os íons produtos monitorizados são apresentados na Figura 4 A-B. A pressão do gás e a energia de colisão foram otimizadas para uma resposta máxima da fragmentação de m/z 152 para o analito.

Validação Bioanalítica

Seletividade: Nenhuma interferência significativa com o analito ou PI foi encontrada na amostra branco, Figura 2A. As Figuras 2B e 2C mostram os cromatogramas de íon extraído (MRM) das amostras zero (branco adicionado de PI) e LIQ de Aciclovir 4 ng/mL (com um S/R \geq 145 para o LIQ) obtidos a partir de uma corrida analítica regular. Nenhum efeito de cross-talk também foi observado nas transições de massa monitoradas conforme observado nas figuras 2B e 2D, que possam interferir na quantificação de aciclovir. A amostra de plasma branco contendo um pool de todos os possíveis interferentes e medicações concomitantes não apresentaram interferência superior aos critérios de aceitação.

Recuperação: A comparação entre as amostras não extraídas e extraídas são apresentados na Tabela 4. A recuperação do PI também foi testada concomitantemente, utilizando a mesma metodologia, com recuperação média semelhante ao analito, acima de 96%.

Carryover: Ambas as amostra de verificação e comparação (saturação) apresentaram interferência de 0,5% para o analito e menos de 0,2% para o padrão interno. Ou seja, dentro dos critérios de aceitação estabelecidos.

Efeito matriz: O desvio padrão relativo (DPR) das áreas médias de pico de Aciclovir e PI foi de 5,7%, indicando diferença de controle na eficiência de ionização utilizando diferentes amostras de plasma. Além disso, os resultados foram superiores a 96%, sugerindo que a supressão de íons por componentes endógenos não interferiu na exatidão ou repetibilidade do método.

Curva analítica (Linearidade): A linearidade de 3 curvas analíticas foi verificada de 4 a 1000 ng/mL apresentando a equação de regressão dos mínimos quadrados $y = (0,007795 \pm 0,000146) x - (0,000399 \pm 0,003811)$, com um coeficiente de correlação linear, $(r^2) = 0,998333$ $0,000648$ (média $n = 3$). Como a variância do erro não é constante ao longo da faixa de quantificação do método analítico, foi utilizada a ponderação que apresentou o menor valor para soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração versus seus valores obtidos pela equação da curva. O método usado tipo polinomial é linear, o ponto de origem é excluído. A avaliação do peso da ponderação: sem (nenhum), transformação de eixo $1/x$ e $1/x^2$, foi verificado obtendo os seguintes resultados: nenhum= 804, $1/x=163$ e $1/x^2= 139$. Os resultados mostram que a ponderação de $1/x^2$ foi a mais adequada para a aplicação do método bioanalítico.

Precisão e exatidão: Os resultados da validação demonstraram boa precisão e exatidão (Tabela 5), na faixa linearizada apresentada, seus valores de RSD ficaram entre 2,3% e 14,2% para precisão e entre 101,6-112,8% para exatidão em relação à concentração nominal do analito, de acordo com as diretrizes reguladoras.

Estabilidade em plasma: Como mostrado na Tabela 6, as amostras de plasma permaneceram estáveis por pelo menos 170 dias a -20°C (longa duração) e também após quatro ciclos de congelamento e descongelamento demonstrando que amostras de plasma humano poderiam ser descongeladas e congeladas novamente sem comprometer o integridade das amostras. O aciclovir é estável em plasma descongelado por até 6h em temperatura ambiente (curto duração). Os resultados demonstraram que as amostras extraídas podem ser analisadas depois de se manter no amostrador automático por até 47 horas com temperatura do amostrador em 10°C .

Estabilidade em solução: a estabilidade das soluções de trabalho estoque e metanol obtidas foi de 13 dias armazenada em freezer a -20°C e 5 horas em temperatura ambiente. O desvio das soluções de estabilidade foi inferior a 5% quando comparado com soluções recém preparadas.

Aplicação do método bioanalítico e análise estatística e parâmetros farmacocinéticos

O método validado foi usado com sucesso para quantificar o aciclovir em amostras de plasma humano em um estudo de bioequivalência. As curvas de concentração média

versus tempo após a administração de Zovirax® (produto de referência) e aciclovir (produto teste) a 48 voluntários saudáveis são mostradas na Figura 5. A Tabela 7 mostra os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos calculados e a estatística descritiva dos resultados obtidos.

Todas as razões geométricas dos parâmetros farmacocinéticos com intervalo de confiança de 90% (C_{max} , AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$) encontram-se dentro da faixa predeterminada de bioequivalência entre 80% e 125%, como mostrado na tabela 8. As formulações de referência e teste foram consideradas bioequivalentes, de acordo com os resultados da análise estatística.

CONCLUSÃO

Foi desenvolvido e validado um método sensível e rápido por UHPLC-ESI-MS/MS para a determinação de aciclovir em plasma humano. O ensaio é rápido, o tempo de análise é de apenas 5 min, e este método envolve um procedimento de precipitação de proteína de um único passo usando entecavir como PI, onde cerca de 240 amostras podem ser facilmente preparadas e analisadas em um dia de trabalho. Outra vantagem importante que o método apresentou foi a utilização de baixo volume de amostra e reagentes durante a etapa de extração, utilizando apenas metanol e água ultrapura (não tóxica).

Este método envolve um procedimento de extração de precipitação de proteínas, usando o entecavir como padrão interno. Os resultados dos estudos de validação mostram que o método otimizado possui seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão em toda a faixa de concentrações plasmáticas terapêuticas significativas. Dependendo da aplicação analítica, é possível otimizar o LLQ de menos de 4 ng / mL, a relação sinal / ruído para esta amostra foi superior a 145. Além disso, o método proposto foi aplicado com sucesso em um estudo farmacocinético de voluntários humanos saudáveis e os resultados mostraram que as duas formulações de aciclovir estudadas são bioequivalentes.

Agradecimentos

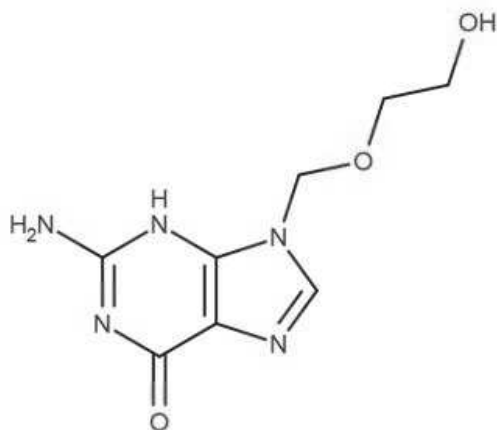
Os autores desejam agradecer Prati, Donaduzzi & Cia Ltda pelo apoio financeiro e Biocinese - Centro de Estudos Biofarmacêuticos pelo suporte do laboratório bioanalítico.

Referências

- [1] DRUGBANK. Acyclovir, Accession number: DB00787. Available in: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00787>. Access on 18.04.2019.
- [2] Balon, K., Riebesehl, Bu., and Muller, B.W. Drug liposome partitioning as a tool for the prediction of human passive intestinal absorption. *Pharmaceutical Research*. **1999**, 16, 882-888.
- [3] ANVISA. *Pharmacopoeia Brazilian*. v.2, Brasília, Brasil; **2010**.
- [4] Brunton, L.L., Lazo, J.S. and Parker, K.L. *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 11 eds. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, **2006**.
- [5] Rang, H.P., Dale, M.M. and Ritter, J.M. *Farmacologia*. 6 eds. Rio de Janeiro: Elsevier, **2016**.
- [6] Zovirax. Zovirax **200 mg tablete**, GlaxoSmithKline México S.A. Available in: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/1634>. Access on 18.04.2019.
- [7] Pugens, A.M., Vieira, D.L., Santos, M.B., Pritsch, M.C., Manfio, J.L. *Estudo de Bioequivalência Farmacêutica de duas Formulações Oraís de Aciclovir em Voluntários Sadios*. Latin American Journal of Pharmacy. **2007**, 26(4), 571-575.
- [8] Junior, L.B., Pugens, A.M., Dal'maso, A., Gomes, E., Santos, M.B. and Manfio, J.L. Validation of a liquid chromatographic method for the determination of acyclovir in human plasma: application to bioequivalence study. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2007**, 30, 2903-2915.
- [9] Mascher, H., Kikuta, C., Metz, R., Vergin, H, New, high-sensitivity high-performance liquid chromatographic method for the determination of acyclovir in human plasma, using fluorometric detection. *Journal of Chromatography*. **1992**, 583, 122-127.
- [10] Brouwer, V.E., Storozhenko. S., Stove, C.P., Daele, J.V., Straeten. D.V.D., Lambert, W.E. Ultra-performance liquid chromatography tandem-mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for the sensitive determination of folates in rice. *Journal of Chromatography B*. **2010**, 878, 509-513.
- [11] Decosterd, L.A., Rochat, B., Pesse. B., Mercier, T., Tissot, F., Widmer. N., Bille, J., Calandra, T., Zanolari, B., Marchetti, O. Multiplex Ultra-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Quantification in Human Plasma of Fluconazole, Itraconazole, Hydroxyitraconazole, Posaconazole, Voriconazole, Voriconazole-N-Oxide, Anidulafungin, and Caspofungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2010**, 54, 5303-5315,
- [12] Swart, K.J., Hundt, H. K. L., Groenewald, A. M. Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of acyclovir in plasma. *Journal of Chromatography A*. **1994**, 663, 65-69.
- [13] Poirier, J.M., Radembino, N., Jaillon, D.P. Determination of acyclovir in plasma by solid-phase extraction and column liquid chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring*. **1999**, 21(1), 129-133.

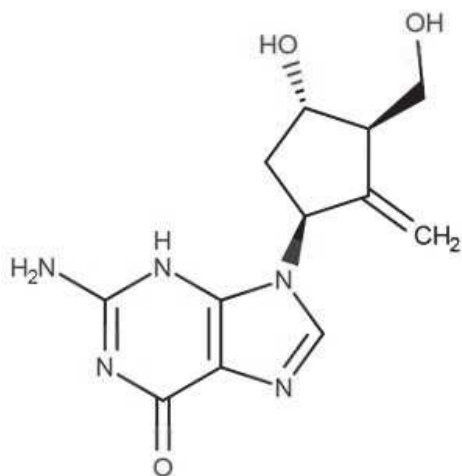
- [14] Fernandez, M., Sepulveda, J., Aranguiz, T., Plessing, C.V. Technique validation by liquid chromatography for the determination of acyclovir in plasma. *Journal of Chromatography B*. **2003**, 791, 357-363.
- [15] Svensson, J.O., Barkholt, L., Sawe, J. Determination of acyclovir and its metabolite 9-carboxymethoxymethylguanine in serum and urine using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. **1997**, 690 (1-2), 363-366.
- [16] Patel N.B., Sanyal, M., Patel, N. and Sharma, N. Validation of sensitive and rugged SPE-LC-MS/MS method for determination of acyclovir in human plasma: application to four pivotal bioequivalence studies. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **2015**, 4(11), 1267-1288.
- [17] Mårtson, A-G., Hateren, K.V., Bosch, G.V.D., Werf, T.V.D., Touw, D., and Alffenaar, J-W.C. Determination of Ganciclovir and Acyclovir in Human Serum using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Applied Bioanalysis*. **2018**, 4(5), 175-186.
- [18] McMullin, C.M., Kirk, B., Sunderland, J., White, L.O., Reeves, D.S. and Macgowan, A.P.A. Simple high performance liquid chromatography (HPLC) assay for acyclovir and ganciclovir in serum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1996**, 38(4), 739-740.
- [19] Bangaru, R.A., Bansal, Y. K., Rao, A.R.M. and Gandhi, T.P. Rapid, simple and sensitive high-performance liquid chromatographic method for detection and determination of acyclovir in human plasma and its use in bioavailability studies. *Journal of Chromatography B*. **2000**, 739(2), 231-237.
- [20] Zendelovska, D., Simeska, S., Atanasovska, E., Georgievska, K., Kikerkov, I., Labachevski, N., Jakovski, K. and Balkanov, T. Determination of Acyclovir in Human Plasma Samples by HPLC Method with UV Detection: Application to Single-Dose Pharmacokinetic Study. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. **2015**, 3(1), 32-36.
- [21] Zeng, L., Nath, C.E., Shaw, P.J., Earl, J.W. and McLachlan A.J. HPLC-fluorescence assay for acyclovir in children. *Biomedical Chromatography*. **2008**, 22(8), 879-887.
- [22] Teshima, D., Otsubo, K., Yoshida, T., Itoh, Y. and Oishi, R. A simple and simultaneous determination of acyclovir and ganciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*. **2003**, 17(8), 500-503.
- [23] Bahrami, G., Mirzaeei, S.A and Kiani, A. Determination of acyclovir in human serum by high-performance liquid chromatography using liquid-liquid extraction and its application in pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*. **2005**, 25, 327-331.
- [24] Shao, C., Dowling, T.C., Haidar, S., Yu, L.X., and Polli, J.E. Quantification of Acyclovir in Human Plasma by Ultra High Performance Liquid Chromatography Heated Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry for Bioequivalence Evaluation. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*. **2012**, 3(4), 1-6.
- [25] Xu, H.R., Li, X.N., Chen, W.L., Liu, G.Y., CHU, N.N. and YU, C.A. Sensitive assay for simultaneous determination of plasma concentrations of valacyclovir and its active metabolite ganciclovir by LC/MS/MS. *Journal of Chromatography B*. **2007**, 848, 329-334.

- [26] Lanças, F.M. Vantagens e limitações da miniaturização em cromatografia líquida. *Scientia Chromatographica*. **2009**, 1(3), 51-60.
- [27] Kanneti, R.; Rajesh, R.; Raj J.R.A. and Bhatt, P.A. An LC–MS–MS Method for the Simultaneous Quantitation of Acyclovir and Valacyclovir in Human Plasma. *Chromatographia*. **2009**, 70(3-4), 407-414.
- [28] Ramesh, N.; Terish, J.D.; Kumar, S. and Jith SL, S. Liquid Chromatography/Positive-Ion Electrospray Tandem Mass Spectrometry Assay for Acyclovir in Human Plasma and Its Application to Pharmacokinetic Study. *Der Pharmacia Sinica*, 2011, 2 (6), 85-92.
- [29] FDA. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2001.
- [30] ANVISA. RDC N° 27/2012, Provides for the minimum requirements for validation of bioanalytical methods used in studies for registration and post-registration purposes. Ministry of Health, National Health Surveillance Agency. Brasilia, DF, 2012
- [31] Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., & Chavez-Eng, C.M. Matrix Effect in Quantitative LC/MS/MS Analyses of Biological Fluids: A Method for Determination of Finasteride in Human Plasma at Picogram Per Milliliter Concentrations. *Analytical Chemistry*. **1998**, 70, 882–889.
- [32] Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcão AC. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods.. *Journal Chromatography B Analyt. Technol. Biomedical Life Science*. **2002**, 774(2), 215-222.
- [32] Chow, S.C., Liu, J.P. *Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies*. 2 eds. New York, USA: Marcel Dekker Inc., **2000**.



Acyclovir

C₈H₁₁N₅O₃
225,2043 g/mol

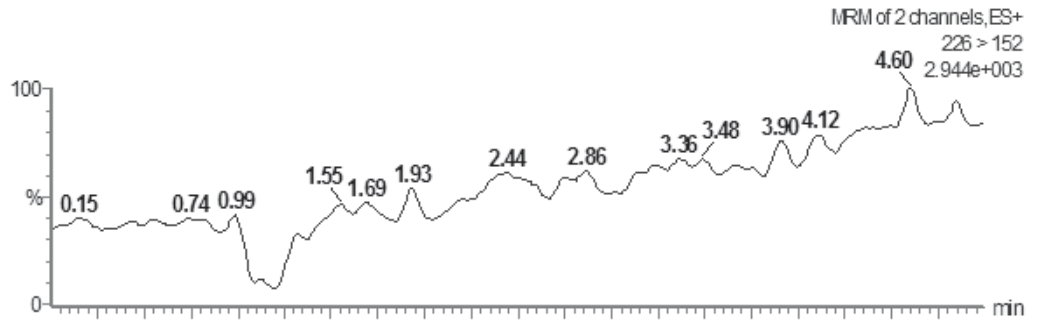
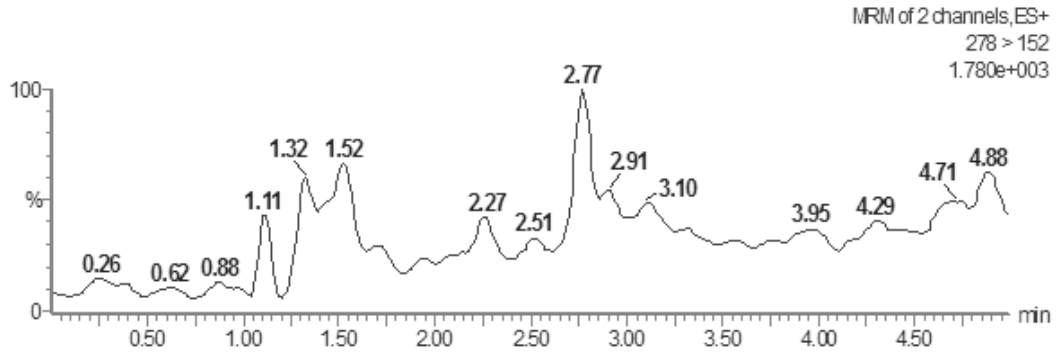
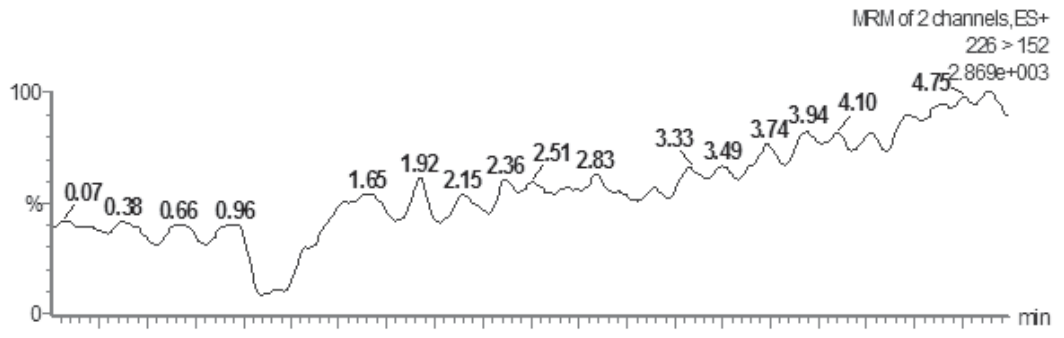


Entecavir

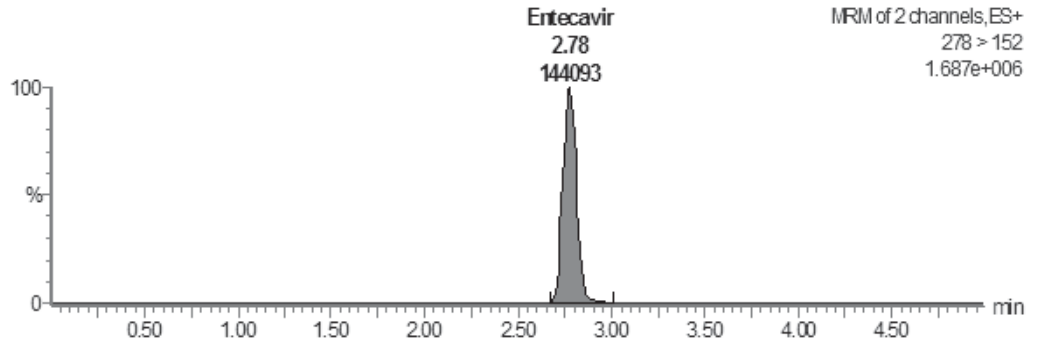
C₁₂H₁₅N₅O₃
277,2792 g/mol

Figura 1. Estrutura química do analito aciclovir e padrão interno entecavir

A



B



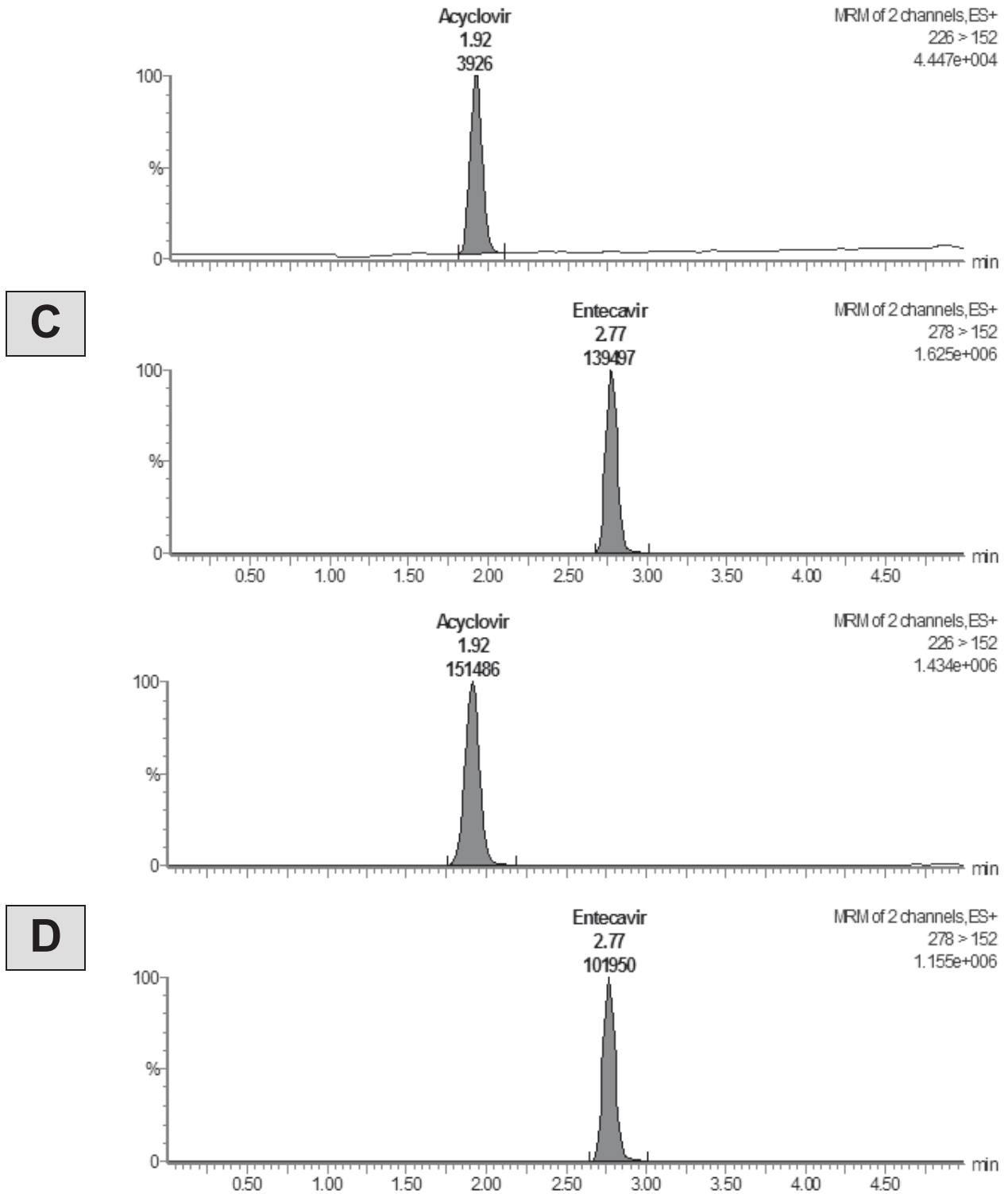


Figura 2. Cromatogramas MRMs de: A) Pool de plasma humano branco normal, B) Cromatograma de matriz em branco do padrão interno, C) amostra LLOQ (4 ng/mL) e D) Uma amostra representativa de voluntário no tempo 1:20 horas.

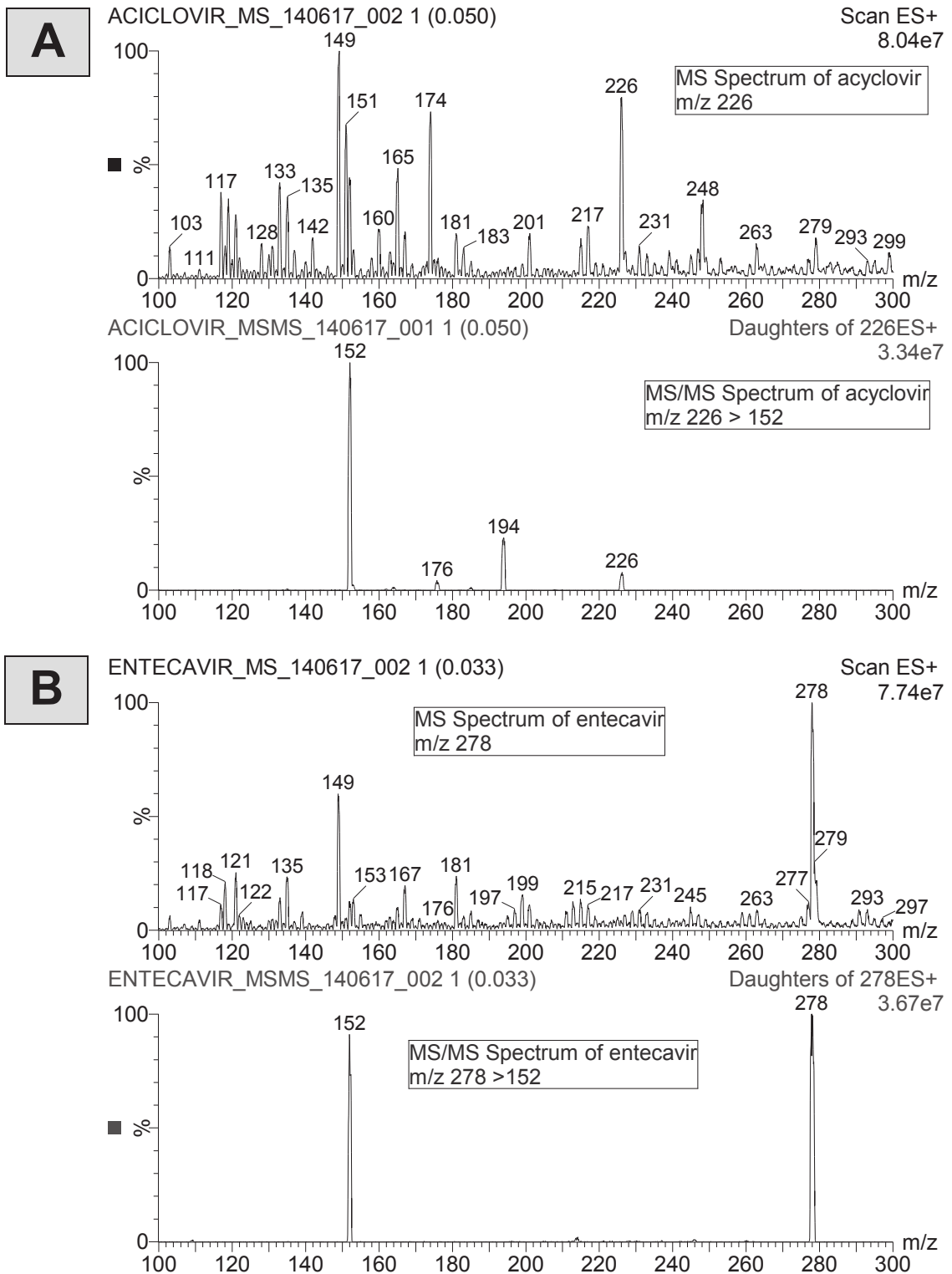


Figura 3. Espectro MS e espectro MS/MS de (A) Aciclovir e (B) Entecavir PI.

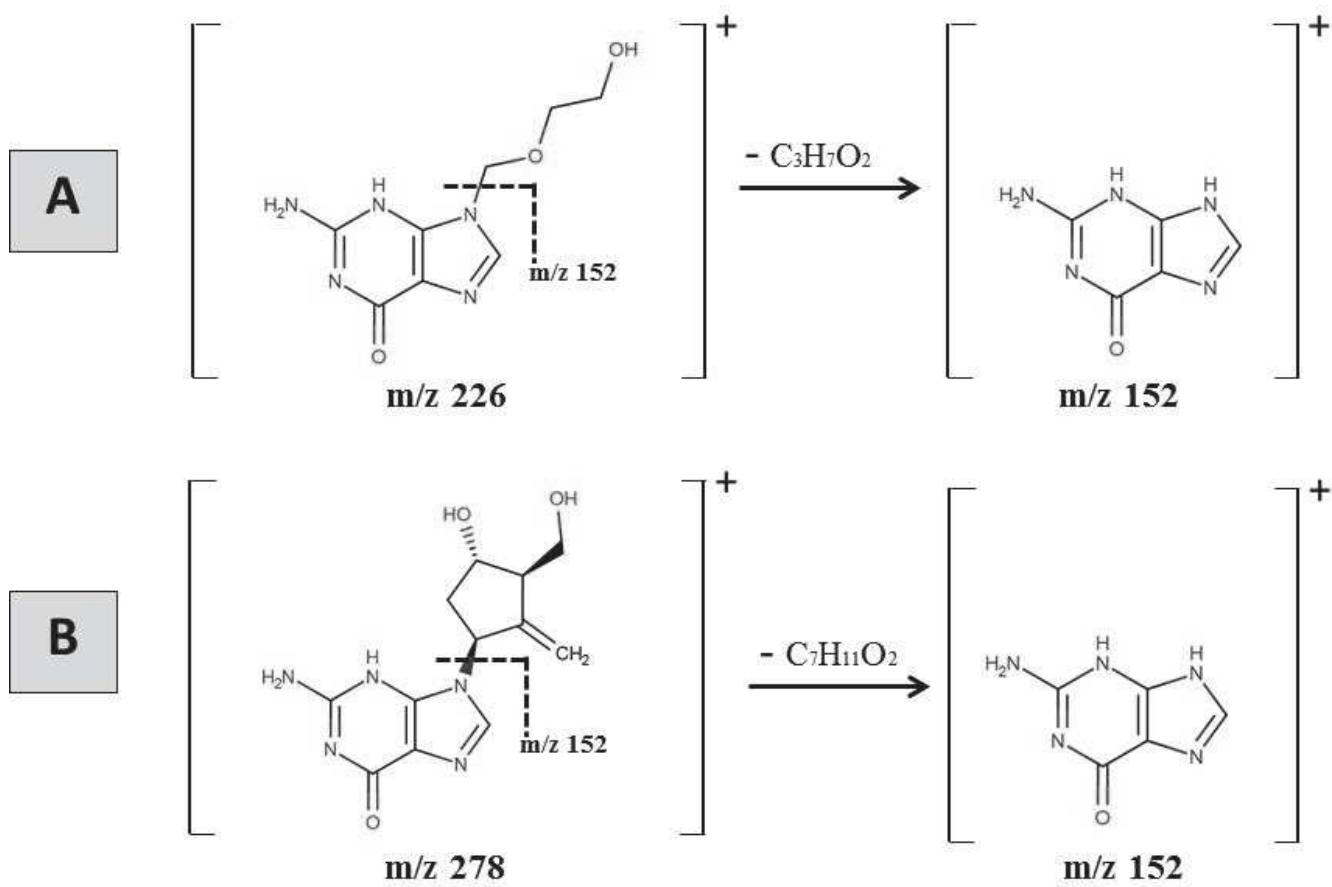


Figura 4. Caminho de fragmentação proposto de (A) Aciclovir e (B) Entecavir PI.

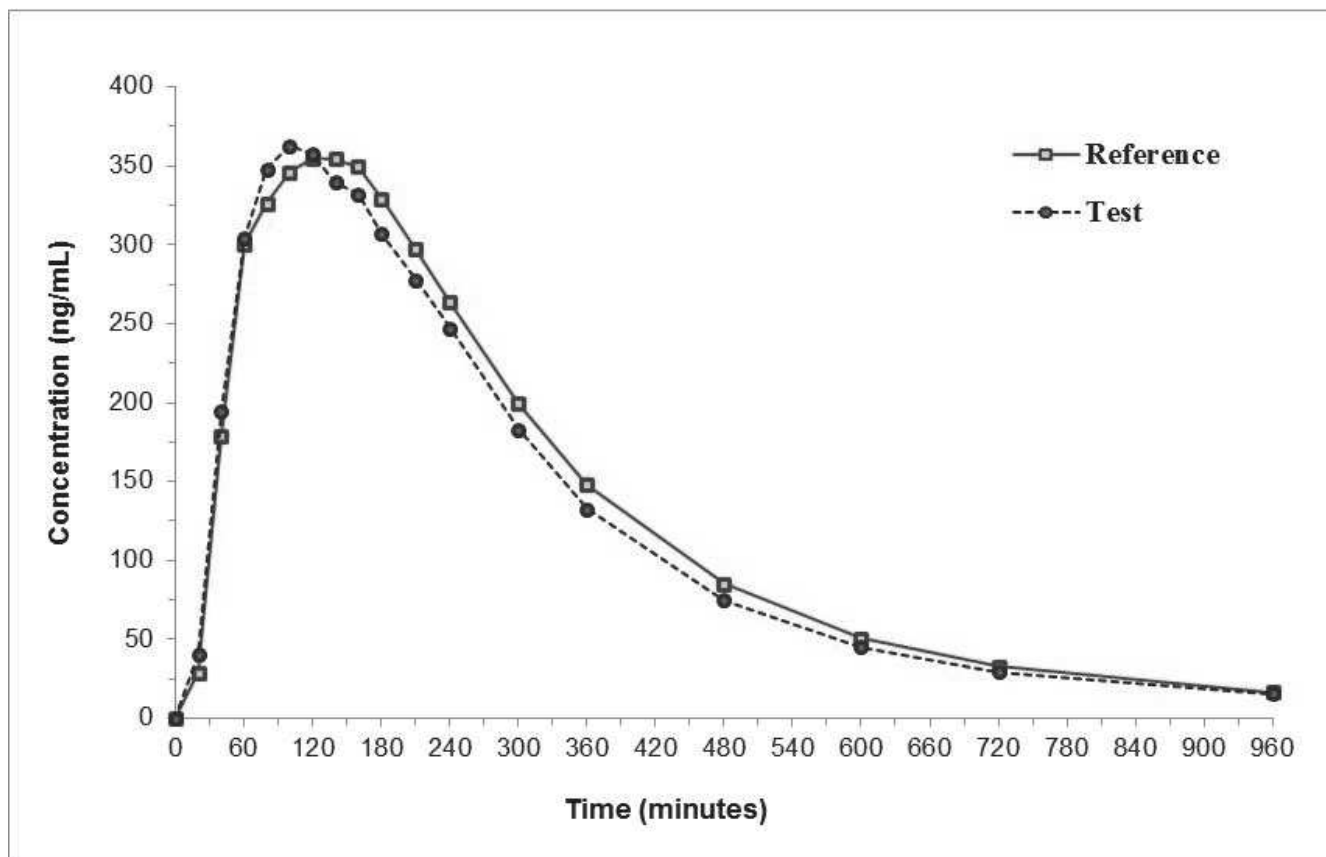


Figura 5. Valor médio da concentração plasmática (ng/mL) após administração do produto referência (Zovirax®, 200 mg) e produto teste (Aciclovir, 200 mg) para 48 voluntários saudáveis.

Tabela 1. Vantagens do método bionalítico desenvolvido versus literatura, apenas por LC-MS/MS

Autores / Referências	Volume de amostras	Extração	Linearidade	Tempo de análise cromatográfica por amostra / equipamento
Kanneti et al 2009 (27)	500 µL plasma	SPE	5 – 1075 ng/mL	5 minutos / LC-MS/MS
Ramesh et al, 2011 (28)	50 µL plasma	LLE Diethyl ether: Isopropyl alcohol (1:1 v/v)	82 – 4006 ng/mL	2 minutos / LC-MS/MS
Shao et al, 2012 (24)	200 µL plasma	Precipitação de proteínas com 1 mL de acetonitrila com subsequente evaporação	1 – 2000 ng/mL	5 minutos / UHPLC-MS/MS
Patel et al, 2015 (16)	200 µL plasma	SPE	5 – 2500 ng/mL	3.5 minutos / LC-MS/MS
Martson et al, 2018 (17)	10 µL plasma	Precipitação de proteínas com 0.5 mL de acetonitrila, injeção do extrato	100 – 20000 ng/mL	3.5 minutos / LC-MS/MS
Proposto	100 µL plasma	Precipitação de proteínas com 0.35 mL de metanol com subsequente diluição usando água	4 - 1000 n g/mL	5 minutos / UHPLC-MS/MS

Tabela 2. Proporção gradiente da Fase Móvel

Fase Móvel A: 0.1% ácido fórmico

Fase Móvel B: Metanol + 0.1% ácido fórmico

Tabela 3. Comparação das propriedades físico químicas do analito e PI

Propriedades químico físicas	Aciclovir	Entecavir
Solubildiade água	9.08 mg/mL	6.59 mg/mL
logP	-0.95	-0.81
pka (Ácido Forte)	7.99	8
pka (Base Forte)	2.63	2.77

Fonte: Drugbank

Tabela 4. Recuperação de Aciclovir e Entecavir (PI) após procedimento de extração

CQ	Recuperação (%) (média ± RDS%)	
	Aciclovir ^a	PI ^a
Baixo	97.1 ± 4.8	96.6 ± 3.7
Medio	95.5 ± 4.1	97.5 ± 2.9
Alto	98.2 ± 3.3	99.7 ± 4.6
Média	96.9 ± 4.1	97.9 ± 3.7

^aMédia das seis replicatas

CC: 12 (baixo), 375 (medio), 750 ng/mL (alto).

Tabela 5. Precisão intra e inter-dia e exatidão da determinação de Aciclovir em plasma humano

Controle de Qualidade (CQ)	Intra-dia		Inter-dia	
	RSD (%)	Exatidão (%)	RSD (%)	Bias ^a (%)
LOQ	14.2	111.7	5.3	105.8
Baixo	3.5	104.4	3.1	101.6
Medio	2.5	111.0	9.4	103.8
Diluição	3.5	112.8	3.7	108.3
Alto	2.3	105.7	3.5	101.7

^a Bias = [(concentração média – concentração nominal) / concentração nominal] x 100.

CQ: 4 (LOQ) 12 (baixa), 375 (medio), 750 (alto) e 1200 ng/mL (Diluição).

Tabela 6. Resumo da estabilidade de Aciclovir em plasma humano

Estabilidade	CQ	RSD (%)	Bias (%)^a
Tempo Zero	Baixa	2.2	110.4
	Alta	1.4	103.5
Amostrador Automático 47 horas	Baixa	1.2	113.5
	Alta	2.5	107.8
Quatro ciclos de congelamentos e descongelamento	Baixa	4.9	105.0
	Alta	2.5	104.7
Longa duração^b 170 dias	Baixa	2.0	111.9
	Alta	6.2	108.8
Curta duração^c 6 horas	Baixa	8.6	100.2
	Alta	6.4	101.6

^a Bias = (concentração média – concentração nominal / concentração nominal) x 100

^b Longa duração = estabilidade pelo menos 170 dias a -20 °C

^c Curta duração = estabilidade em plasma até 6 horas à temperatura ambiente
12 (baixo) e 750 (alto)

Tabela 7. Parâmetros farmacocinéticos primários e secundários de Aciclovir, calculados com base no tempo nominal, para formulação Teste e Referência

FORMULAÇÃO	PARÂMETRO	T _{máx} (hr)	C _{máx} (ng/mL)	K _{el} (1/hr)	T _{1/2} (hr)	ASC _{0-t} (h x ng/mL)	ASC _{0-inf} (h x ng/mL)
TESTE	Média	1.859	447.330	0.193	3.874	1950.647	2039.829
	Desvio Padrão	0.958	174.786	0.048	1.351	696.452	693.131
	Mínimo	0.670	178.076	0.068	2.318	932.220	1018.591
	Máximo	5.000	932.250	0.299	10.225	3854.490	4024.418
	RSD (%)	0.515	0.391	0.248	0.349	0.357	0.340
REFERÊNCIA	Média	1.939	462.291	0.197	3.814	2054.192	2144.974
	Desvio Padrão	1.108	202.588	0.051	1.277	858.707	868.019
	Mínimo	0.670	*9.599	0.073	2.055	608.910	671.855
	Máximo	6.000	1002.425	0.337	9.524	4814.590	5043.147
	RSD (%)	0.572	0.438	0.260	0.335	0.418	0.405

Tabela 8. Resultado das análises estatísticas

PARÂMETRO	N	Razão (%)	Limite inferior (%)	Limite superior (%)	Poder do teste (%)	p valor (efeito de sequência)
C _{máx}	48	99.475	91.922	107.650	99.816	0.246
ASC _{0-t}	48	97.417	90.931	104.366	99.975	0.281
ASC _{0-inf}	48	97.530	91.373	104.102	99.990	0.212

Conclusão Final: Bioequivalente

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química do analito aciclovir e padrão interno entecavir

Figura 2. Cromatogramas MRMs de: A) Pool de plasma humano branco normal, B) Cromatograma de matriz em branco do padrão interno, C) amostra LLOQ (4 ng/mL) e D) Uma amostra representativa de voluntário no tempo 1:20 horas.

Figura 3. Espectro MS e espectro MS/MS de (A) Aciclovir e (B) Entecavir PI

Figura 4. Caminho de fragmentação proposto de (A) Aciclovir e (B) Entecavir PI.

Figura 5. Valor médio da concentração plasmática (ng/mL) após administração do produto referência (Zovirax®, 200 mg) e produto teste (Aciclovir, 200 mg) para 48 voluntários saudáveis.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Vantagens do método bionalítico desenvolvido versus literatura, apenas por LC-MS/MS

Tabela 2. Proporção gradiente da Fase Móvel

Tabela 3. Comparação das propriedades físico químicas do analito e PI

Tabela 4. Recuperação de Aciclovir e Entecavir (PI) após procedimento de extração

Tabela 5. Precisão intra e inter-dia e exatidão da determinação de Aciclovir em plasma humano

Tabela 6. Resumo da estabilidade de Aciclovir em plasma humano

Tabela 7. Parâmetros farmacocinéticos primários e secundários de Aciclovir, calculados com base no tempo nominal, para formulação Teste e Referência

Tabela 8. Resultado das análises estatísticas