



## Estudo de Bioequivalência Farmacêutica de duas Formulações Oraís de Aciclovir em Voluntários Sadios

Ana M. PUGENS \* Daiane L. VIEIRA, Maurício B. dos SANTOS,  
Mariely C. PRITSCH & Josélia L. MANFIO

*Biocinese - Centro de Estudos Biofarmacêuticos, Av. Ministro Cirne de Lima 1541  
CEP 85903-590 - Toledo-PR, Brasil*

**RESUMO.** Este estudo tem com objetivo avaliar a bioequivalência de duas formulações de aciclovir 200 mg comprimido. O estudo foi aberto, randomizado, dois períodos crossover com uma semana de washout. As amostras de sangue foram coletadas por um período de 16 h após a administração do produto referência, Zovirax® e o produto teste, Aciclovir para 32 voluntários em jejum. Um método simples, exato, preciso e sensível, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvido e validado para quantificação de aciclovir em plasma após extração líquido - líquido. A bioequivalência entre os produtos foi determinada através do cálculo de intervalo de confiança (90%) para a razão das médias geométricas,  $C_{max}$ ,  $ASC_{0-t}$  and  $ASC_{0-\infty}$ , dos dados transformados dos produtos teste e referência. O intervalo de confiança 90% para a razão de  $C_{max}$  foi 83.86% e 105.83%,  $ASC_{0-t}$  86.67% e 111.37%,  $ASC_{0-\infty}$  87.76% e 110.87%, estes valores estão dentro do intervalo de 80-125%, proposto pela ANVISA. Conclui-se que as duas formulações são bioequivalente quanto à taxa e extensão de absorção.

**SUMMARY.** "Bioequivalence Study of Two Formulations of Acyclovir in Healthy Volunteers". The purpose of this study was to evaluate bioequivalence of two commercial 200 mg tablet formulations of acyclovir. The study was an open, randomized, two-period crossover trial with a 1-week washout interval. Blood samples were collected throughout a 16-h period after administration of reference product, Zovirax® and test product, Acyclovir to 32 fasting volunteers. A simple, accurate, precise and sensitive high-performance liquid chromatographic (HPLC) method with ultraviolet detection was developed and validated for quantification of acyclovir in plasma samples after liquid-liquid extraction. Bioequivalence between the products was determined by calculating 90% confidence intervals (90% I.C) for the ratio of  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$  and  $AUC_{0-\infty}$  values for the test and reference products, using logarithmic transformed data. The 90% confidence intervals for the ratio of  $C_{max}$  (83.86-105.83%),  $AUC_{0-t}$  (86.67-111.379%) and (87.76-110.87%) values for the test and reference products are within the 80-125% interval, proposed by ANVISA. It was concluded that the two acyclovir formulations are bioequivalent in their rate and extent of absorption.

### INTRODUÇÃO

O Aciclovir é um análogo acíclico do nucleotídeo guanina, é estruturalmente diferenciado da guanina através da presença de um acíclico na cadeia lateral<sup>1</sup>. Possui uma atividade antiviral potente, usado no tratamento de infecções pelo vírus herpes, principalmente herpes simples e varicela-zoster simples<sup>1,2</sup>.

Devido a sua semelhança com substâncias endógenas, a análise de aciclovir necessita de métodos analíticos de alta seletividade, técnicas

imunológicas e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são os métodos mais comuns para determinação desta droga em material biológico<sup>3</sup>.

Após administração oral de aciclovir, os parâmetros farmacocinéticos são altamente variáveis, as concentrações plasmáticas máximas encontradas variam de 0,595 - 1,065 µg/mL após única dose de 400mg, o tempo para atingir esta concentração é de 1,5 a 2,5 h, a meia vida de eliminação plasmática varia de 2,83-4,70 h<sup>4</sup>. A

**PALAVRAS CHAVE:** Aciclovir, Bioequivalência, Farmacocinética.

**KEY WORDS:** Acyclovir, Bioequivalence, Pharmacokinetic.

\* Autor a quem correspondência deve ser enviada. E-mail: biocinese@biocinese.com.br

biodisponibilidade oral do Aciclovir varia de 10 a 30% e diminui com o aumento da dose <sup>5,6</sup>.

O estudo de bioequivalência é de fundamental importância, pois a partir deste é que garantimos a intercambiabilidade entre o medicamento referência e seu genérico, considerando que ambos apresentem a mesma biodisponibilidade, isto é, velocidade e extensão da absorção <sup>7</sup>. A biodisponibilidade é necessária para que medicamento apresente segurança e eficácia terapêutica.

Este estudo tem por objetivo avaliar, em voluntários sadios, a biodisponibilidade de dois produtos contendo aciclovir 200 mg a fim de determinar se são bioequivalentes. O produto teste será o Aciclovir 200 mg Prati, Donaduzzi e o produto referência o Zovirax<sup>®</sup> 200 mg Laboratório Glaxo Wellcome.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Materiais**

Aciclovir 200 mg (medicamento teste, Laboratório Prati, Donaduzzi), Zovirax 200 mg (medicamento referência, Laboratório Glaxo Wellcome), Aciclovir (fármaco, padrão primário, Fio-Cruz) e Guanina (padrão interno, padrão secundário, Sigma Aldrich).

### **Reagentes**

Água Ultra-pura, ácido Fórmico Grau HPLC (Carlo Erba) e acetonitrila Grau HPLC (Carlo Erba).

### **Equipamentos**

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE Shimadzu), ultra freezer (ILSHIN), micropipetas automáticas EP 200, 1000 e 5000 µL (WinNolin, Pharsight).

### **Seleção de Voluntários**

Foram selecionados 36 voluntários de ambos os sexos com idade entre 18 e 50 anos, o índice de massa corpórea entre 19 e 27, sem doenças significativas a juízo médico. Antes e após a realização do estudo os voluntários foram submetidos ao processo de seleção: história clínica, exame clínico, exames laboratoriais e eletrocardiograma. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Curitiba - PR. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi apresentado a todos os voluntários, os quais assinaram o mesmo antes da realização do estudo.

### **Desenho do Estudo**

Estudo aberto, randomizado cruzado, 2 ad-

ministrações, 2 períodos (2 seqüências), dose única por via oral. Os voluntários foram aleatoriamente designados a uma seqüência de tratamento (T/R ou R/T onde T -Teste e R -Referência).

### **Metodologia bioanalítica**

As amostras de plasma contendo o fármaco Aciclovir foram analisadas por CLAE usando Guanina como padrão interno. Um total de 500 µL de plasma foi transferido para tubo de 15 mL e adicionado 50 uL de solução padrão interno (40 ug/mL em água purificada).

A extração foi realizada com 4 mL de acetonitrila a qual foi Acidificada 0,2% com ácido acético. As amostras foram agitadas em vortex por 2 min e centrifugadas por 25 min em 3500 rpm sob temperatura de 25 °C. Após centrifugação, a fase orgânica foi separada e evaporada até secagem com nitrogênio em temperatura de 45 °C. O resíduo foi dissolvido em 200 uL de água purificada. A fase móvel foi constituída de ácido fórmico 1% e acetonitrila na proporção inicial de 99:1 até 7,5 min, de 7,5 a 10,5 min a proporção mudou para 1:99 de Ácido Fórmico 1% e acetonitrila, de 10,5 a 16,0 min retornou a proporção inicial. A análise foi efetuada sob fluxo de 1,0 mL/min e o volume de injeção foi de 40 uL.

O sistema cromatográfico utilizado foi Shimadzu (Kyoto, Japan), modelo SCL-10AVP com sistema de bombeamento quaternário e degaser automático. A detecção foi realizada por fluorescência com excitação em 270 nm e emissão em 380 nm. A separação cromatográfica foi efetuada com coluna Shim-Pack RP 18 (150 x 4,6 mm, 5µm).

O cálculo de concentração das amostras foi realizado pelo software Class-Vp através da razão da área pico do Aciclovir e do padrão interno Guanina em função da curva de calibração que utiliza o método de regressão linear, aplicando-se o peso da regressão 1/x<sup>2</sup>, gerando uma equação de reta:  $y = ax+b$ , onde **y** corresponde à relação das áreas de Aciclovir/Guanina e **x** corresponde à concentração de Aciclovir; **b** corresponde à intersecção da reta no eixo y e **a** corresponde à inclinação da reta <sup>8</sup>.

### **Análise Farmacocinética**

O pico de concentração máxima ( $C_{máx}$ ) e o tempo para atingir esta concentração ( $T_{máx}$ ) foram obtidos diretamente dos dados de concentração plasmática versus o tempo. A constante de eliminação ( $K_{el}$ ) foi obtida através do coeficiente de inclinação da reta de regressão ajusta-

da em pelo menos três últimos valores de concentração transformados em  $\log_{10}$ . A área sob a curva de concentração versus tempo, do tempo zero até o tempo da última coleta ( $ASC_{0-t}$ ), foi obtida pelo método dos trapézóides <sup>9</sup>.

### Análise Estatística

Os parâmetros farmacocinéticos  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $ASC_{0-t}$  e  $ASC_{0-\infty}$ , foram analisados após transformação logarítmica ( $\ln$ ). Foi empregada análise de variância (ANOVA) apropriada para o modelo *crossover*, sob os dados de  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $ASC_{0-t}$  e  $ASC_{0-\infty}$ , a qual leva-se em conta em seu modelo os efeitos de seqüência, voluntário dentro da seqüência, tratamento e período <sup>10</sup>. Foi construído um intervalo de confiança (IC) de 90% para a razão das médias geométricas dos dados transformados dos medicamentos teste e referência (teste/referência). Dois medicamentos são considerados bioequivalentes, quando o IC 90% da razão das médias se encontrarem entre 80 e 125% <sup>11</sup>.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Participaram do estudo 32 voluntários (16 homens e 16 mulheres), com idade média de 26,03 anos, peso médio de 66,68 Kg, e altura média de 1,70 cm. Estes voluntários foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão do estudo <sup>11</sup>. O estudo contemplou dois períodos de internação de 24:00 intercalados pelo período de uma semana. Os voluntários foram confinados em clínica conveniada, permaneceram aproximadamente 8:00 em jejum antes da administração, que foi iniciada às 6:00 da manhã. Durante o período de confinamento os voluntários receberam dieta padronizada e tiveram seus sinais vitais (pressão, pulso e temperatura) constantemente monitorados.

Os eventos adversos ocorridos foram cefaléia frontal, náusea, vômito, sudorese, palidez e hipotensão arterial, sendo estes não classificáveis quanto a sua relação ou não à ingestão do medicamento.

A amostra de sangue de pré-dose foi coletada em tubo vacutainer contendo heparina sódica como anticoagulante, aproximadamente 60 min antes da administração (10 mL). As demais amostras foram coletadas os seguintes tempos: 0:15; 0:30; 0:45; 1:00; 1:15; 1:30; 1:40; 1:50; 2:00; 2:10; 2:20; 2:30; 2:45; 3:00; 3:15; 3:30; 3:45; 4:00; 6:00; 8:00; 10:00; 12:00 e 16:00 h. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a temperatura de 4 °C, o plasma foi transferido para tubos criogênicos, armazenados em freezer -20 °C. Após o congelamento das amostras, as

mesmas foram transportadas para laboratório analítico.

No desenvolvimento do método bioanalítico foi verificado que alguns estudos utilizaram agentes precipitantes na técnica de extração, porém no presente estudo utilizamos acetônitrila que proporcionou maior purificação das amostras conseqüentemente um método mais econômico <sup>6</sup>. A faixa de linearidade utilizada foi de 20 a 3000 ng/mL, ao utilizarmos um Limite Inferior de Quantificação de 20 ng/mL obtivemos um método mais sensível do que o apresentado por Poirier <sup>12</sup>.

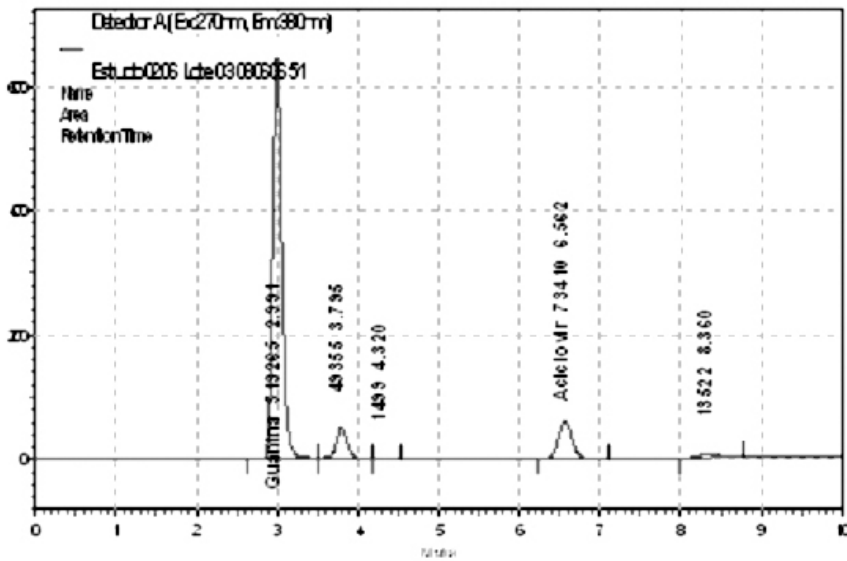
A concentração dos Controles de Qualidade utilizados foram 50 ng/mL para CQB (controle de qualidade baixo), 400 ng/mL para CQM (controle de qualidade médio) e 1500 ng/mL para CQA (controle de qualidade alto).

O método empregado foi validado de acordo com a legislação vigente <sup>8</sup> e a estabilidade do fármaco no plasma também foi comprovada. Os parâmetros avaliados na validação do método foram: precisão e exatidão onde encontrou-se resultados médios de 4,78% para CV e 101,03% para exatidão, no parâmetro linearidade o coeficiente de correlação encontrado foi de  $R^2 = 0,9995$  obtendo coeficiente angular de 0,0004 e intercepto da reta de 0,0022 e na recuperação, os valores médios encontrados foram de 82,22% para Aciclovir e de 76,01% para padrão interno Guanina. Em relação à estabilidade, as amostras permaneceram-se estáveis nos 3 ciclos de congelamento e descongelamento, curta duração T 8 h, pós-processamento T 24h e por um período de 42 dias na longa duração à qual contemplou o intervalo entre o período da 1ª coleta até a análise da última amostra. O tempo de corrida obtido neste estudo foi de 10 min, sendo este inferior ao apresentado no trabalho de Bangaru <sup>6</sup>.

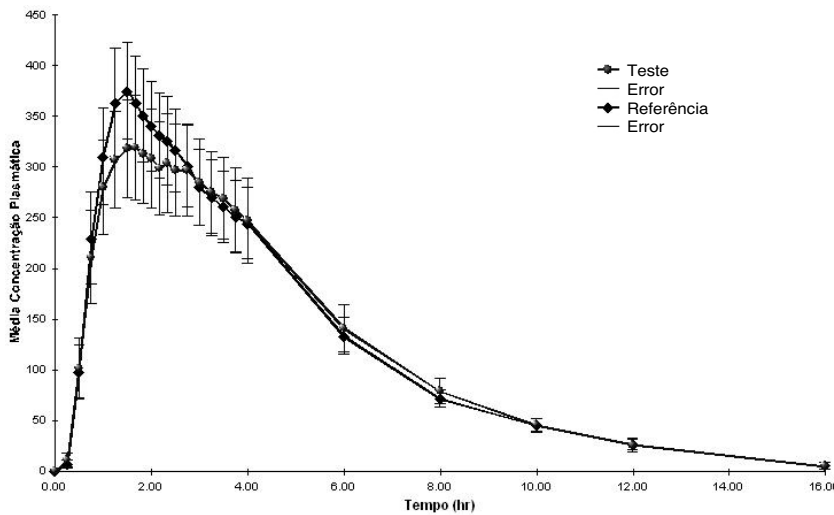
Na Fig. 1 encontra-se o perfil cromatográfico do aciclovir, cujo tempo de corrida foi de 10 min, o tempo de retenção do padrão interno (guanina) foi de aproximadamente 3 min e do aciclovir foi de aproximadamente 6 min.

A curva de concentrações plasmáticas médias versus tempo do medicamento teste e referência estão na Fig. 2. Verifica-se que a absorção, distribuição e eliminação dos medicamentos são semelhantes, nos tempos das maiores concentrações encontrou-se maior variabilidade.

Os parâmetros farmacocinéticos de todos os voluntários e suas respectivas estatísticas descritivas encontram-se na Tabela 1. A média da constante de eliminação ( $K_{el}$ ) foi igual para os dois medicamentos, apenas o coeficiente de va-



**Figura 1.** Perfil Cromatográfico de Aciclovir



**Figura 2.** Curva de Concentração Plasmática dos Medicamentos Aciclovir e Zovirax® dos 32 voluntários saudáveis.

riação foi levemente maior para o medicamento referência comparado ao medicamento teste. A meia vida plasmática ( $T_{1/2}$ ) também obteve comportamento semelhante para os dois produtos, sendo a média aproximadamente de 3 h contemplando assim pelo menos 3 meias vidas exigidas pelo órgão regulador.

Os resultados da ANOVA para o parâmetro  $C_{máx}$ , mostram que houve diferença significativa ( $p=0.0038$ ) referente ao efeito do voluntário dentro da seqüência, mostrando a presença de variabilidade inter-individual. Para os demais efeitos, seqüência, formulação e período, os p-valores encontrados foram: 0.5942, 0.3908 e 0.9122, respectivamente, indicando que não houve diferença significativa para estes efeitos ao nível de significância de  $\alpha=0.05$ . Para o parâmetro  $ASC_{0-16}$  também foi verificada diferença significativa ( $p=0.0145$ ) referente ao efeito do

voluntário dentro da seqüência, mas para os efeitos de seqüência, formulação e período não houve diferença significativa ( $\alpha=0.05$ ) cujos seus respectivos p-valores foram: 0.5411, 0.8118 e 0.8515. Obteve-se resultados semelhantes para o  $ASC_{0-\infty}$ . Portanto os resultados ANOVA para os três parâmetros citados acima, indica a igualdade das médias de biodisponibilidade do medicamento Zovirax® e Aciclovir. Este resultado não implica na bioequivalência entre as formulações.

A razão das médias geométricas do parâmetro  $C_{máx}$  foi 94,21% obtendo-se um IC 90% de 83,86% e 105,83%. Para o parâmetro  $ASC_{0-16}$  a razão das médias geométricas foi 98,25% obtendo-se um IC 90% de 86,67% e 111,37%, já para o parâmetro  $ASC_{0-\infty}$  a razão foi de 98,64% obtendo-se um IC 90% de 87,76% e 110,87%. O poder do teste obtido neste estudo foi superior

Parâmetro Farmacocinético	Zovirax®	Aciclovir
<b>T<sub>máx</sub> (h)</b>		
Média (DP)	1,60 (0,70)	1,88 (0,89)
CV(%)	43,51	47,25
<b>C<sub>máx</sub> (ng/mL)</b>		
Média (DP)	416,15* (155,54)	392,05* (132,08)
CV(%)	35,00	31,80
<b>Kel (1/h)</b>		
Média (DP)	0,25 (0,07)	0,25 (0,06)
CV(%)	27,77	25,09
<b>T<sub>1/2</sub> (h)</b>		
Média (DP)	3,10(1,17)	2,95 (0,88)
CV(%)	37,92	29,68
<b>ASC<sub>0-16</sub> (ng/mL . h)</b>		
Média (DP)	1718,20* (579,50)	1687,99* (638,36)
CV(%)	31,62	35,30
<b>ASC<sub>0-∞</sub> (ng/mL . h)</b>		
Média (DP)	1845,68* (584,74)	1820,50* (641,77)
CV(%)	29,91	33,21

**Tabela 1.** Parâmetros Farmacocinéticos das Formulações e Referência e Teste do Medicamento Aciclovir 200 mg. \* Média Geométrica.

a 90% indicando que o número de voluntários submetidos ao estudo foi suficiente para garantir a confiabilidade dos resultados.

Bahrami *et al.*<sup>3</sup>, em um estudo com 12 voluntários obtiveram um T<sub>máx</sub> médio de 2,42 h e 2,81 h, C<sub>máx</sub> médio de 801,3 e 791,1 ng/mL, ASC<sub>0-1</sub> de 3817,4 e 3834,2 ng/mL, ASC<sub>0-∞</sub> de 4548,7 e 4369,4 ng/mL para a formulação referência e teste respectivamente, após administração de aciclovir 400 mg. Em outro estudo com o mesmo número de voluntários, Bangaru *et al.*<sup>6</sup> obtiveram parâmetros farmacocinéticos semelhantes, após a administração da mesma dose.

Observando os parâmetros farmacocinéticos apresentados na Tabela 1, indicamos que o medicamento em estudo pode apresentar uma farmacocinética linear.

## CONCLUSÃO

Considerando que o intervalo de confiança de 90% para a razão entre as médias geométricas de C<sub>máx</sub>, ASC<sub>0-16</sub> e ASC<sub>0-∞</sub>, relativo à formulação teste de Aciclovir comprimido 200 mg está dentro do intervalo estabelecido pela legislação vigente<sup>11</sup>, conclui-se que esta formulação é bioequivalente à formulação do Zovirax® comprimido 200 mg produzido pela Glaxo Wellcome, quanto à taxa e extensão de absorção.

**Agradecimentos.** Este estudo foi patrocinado pela Indústria Farmacêutica Prati, Donaduzzi & Cia Ltda-Toledo/PR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Goodman & Gilman (2006) As Bases Farmacológicas da Terapêutica, Ed. McGraw-Hill Interamericana do Brasil, Rio de Janeiro, págs. 1122-3.
- Silva, P. (2006) "Farmacologia" Ed. Guanabara, Rio de Janeiro.
- Bahrami, G., S. Mirzaeei & A. Kiani (2005) *J. Chromatogr. B.* **816**: 327-31.
- McEvoy G.K. (1998) AHFS Drugs Information, American Society of Hospital Pharmacists, Bethesda, MD, 471-80.
- Wagstaff, A.J., D.Faulds & K.L. Goa (1994) *Drugs* **47**: 153-205.
- Bangaru, R.A., Y.K. Bansal, A.R.M. Rao & T.P. Gandhi (2000) *J. Chromatogr. B* **739**: 231-7.
- Dighe, S.V.(1999) *A review of the safety of generic drugs*. Transplant. Proc. New York, vol 31, suppl. 3A.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003) Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos RE N° 899, de 29 de Maio de 2003. Diário Oficial da União, Brasília.
- Chow, S. & J. Pei Liu (2000) "Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence studies". New York:Marcel Dekker. Págs. 8-10.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003) *Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade*. RE N° 898, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Brasília.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2006) *Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos*. RE N° 1170, de 19 de abril de 2006 Diário Oficial da União, Brasília.
- Poirier J. M., Redembino N., & Jailon P. (1999) *Ther. Drug Monit.* **21**: 129.