

Desenvolvimento acelerado de formulações através de metodologias expeditas para análise qualitativa de formas sólidas e semi-sólidas

Nelson Manuel Fernandes Casimiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Farmacêutica

Orientadores: Prof. João Pedro Martins de Almeida Lopes

Prof. José Monteiro Cardoso de Menezes

Júri

Presidente: Prof. Pedro Paulo de Lacerda e Oliveira Santos

Orientador: Prof. João Pedro Martins de Almeida Lopes

Vogal: Prof. Helena Margarida Oliveira Marques Ribeiro

Outubro 2017

Resumo

Apesar dos progressos tecnológicos existentes no âmbito do desenvolvimento de produtos farmacêuticos, a sua aplicação no âmbito do desenvolvimento de genéricos ainda assenta numa forte base empírica, levando a um grande consumo de recursos e de tempo.

A presente dissertação tem como finalidade apresentar um processo de desenvolvimento acelerado de genéricos através de metodologias expeditas, com o objetivo de apresentar uma formulação através de engenharia reversa aplicada ao produto de referência, fornecendo uma abordagem mais direcionada no seu desenvolvimento, no intuito de conceber produtos genéricos de uma forma robusta e eficiente.

O produto de referência foi a pomada Zovirax 5%, composta por 5%(m/m) de aciclovir e 95%(m/m) de base de polietilenoglicol.

Este projeto foi idealizado considerando duas abordagens: a abordagem qualitativa e quantitativa.

A abordagem qualitativa foi realizada recorrendo à espectrometria de massa e à cromatografia gasosa. Posteriormente, foi realizado um delineamento experimental para planificar a metodologia a seguir no sentido de desenvolver uma análise quantitativa.

A análise quantitativa foi baseada na espectroscopia de infravermelho próximo. A aferição da composição qualitativa foi conseguida pela análise multivariada aplicada a espectros de amostras produzidas de acordo com um delineamento experimental a lotes do produto de referência. Metodologias baseadas na análise de componentes principais e classificação hierárquica foram utilizadas para estimar a composição quantitativa da formulação alvo.

Os resultados permitiram determinar a composição da base de polietilenoglicol (mistura de polietilenoglicol 300 e polietilenoglicol 1500) assim como a sua proporção relativa. A metodologia utilizada demonstrou ser eficiente tanto ao nível da aferição da composição como da quantificação, permitindo ainda uma fácil extrapolação para outros produtos, sendo assim uma abordagem adequada de apoio ao desenvolvimento acelerado de produtos genéricos.

Palavras-chave: Engenharia reversa; Espectrometria de massa; Espectroscopia de infravermelho próximo; Delineamento experimental; Aciclovir; Polietilenoglicol

Abstract

Despite technological advances, most pharmaceutical companies do not have an implemented methodology for generic product development supported by these technologies yet, developing their generic products on a strong empirical basis, leading to a greater consumption of resources and time.

The present dissertation aims to present a process of accelerated development of generics through expeditious methodologies, with the objective of presenting a formulation through reverse engineering to the reference product, providing a more focused approach in its development, ending up supplying generic products quite similar with their references.

The reference product was Zovirax 5% ointment, consisting of 5% (w/w) acyclovir and 95% (w/w) polyethylene glycol base.

This project is divided into two areas: qualitative analysis and quantitative analysis.

Qualitative analysis was performed using mass spectrometry and gas chromatography. With the data obtained, a design of experiments was carried out to plan the samples to be produced for the quantitative analysis.

The quantitative analysis was carried out using the near-infrared spectra of the samples, pre-treated with a 1st Savitzky-Golay derivative and then a hierarchical analysis of clusters, by comparing the samples produced with batches of the reference product.

The results obtained indicate that the reference product is composed by a polyethylene glycol base with polyethylene glycol 300 and polyethylene glycol 1500, confirming the absence of propylene glycol in its composition. It is found that the methodologies used are a good approach for the accelerated development of a generic product.

Keywords: Reverse engineering, Mass spectrometry, Near infrared spectroscopy, Design of experiments, Acyclovir, Polyethylene glycol

Agradecimentos

Um especial agradecimento ao professor João Almeida Lopes por todo o apoio, orientação, disponibilidade, paciência, opiniões e soluções e conhecimento transmitido.

Agradeço ao Laboratório Medinfar pela oportunidade de realizar a minha dissertação no departamento de Investigação e Desenvolvimento. Foram 5 meses que me permitiram contactar com o ambiente da indústria farmacêutica e aumentar a minha vontade de me desenvolver profissionalmente nesta área. Agradeço também a todos os colaboradores com quem contactei e que me proporcionaram a aquisição de novos conhecimentos e de muitos bons momentos.

Agradeço à Dra. Maria do Rosário Bronze, do laboratório de análise estrutural da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, e ao Dr. Hugo Osório, do IPATIMUP, pela sua disponibilidade e conhecimento transmitido sobre espectrometria de massa.

Mas quero agradecer principalmente à minha família pelo apoio, dedicação e investimento que me concederam e também aos meus amigos pela sua paciência, companheirismo, apoio e confiança.

Índice Geral

Resumo	II
Agradecimentos.....	IV
Índice Geral	V
Índice de Figuras	VII
Índice de Tabelas	IX
Lista de Siglas e Abreviaturas	X
1. Introdução.....	1
1.1 Objetivos.....	3
2. Revisão bibliográfica	4
2.1 Formulações tópicas	4
2.2 Desenvolvimento de formulações tópicas.....	4
2.3 Caracterização do produto de referência	7
2.3.1 Caracterização da substância ativa.....	7
2.3.2 Caracterização dos excipientes.....	9
2.6 Cromatografia gasosa	11
2.7 Delineamento experimental.....	12
2.9 Quimiometria	16
2.9.1 Derivadas (Savitzky-Golay)	17
2.9.2 Aglomeração hierárquica.....	17
3. Materiais e métodos	19
3.1 Análise qualitativa.....	19
3.1.1 Espectrometria de massa (ESI).....	19
3.1.2 Espectrometria de massa (MALDI)	19
3.1.3 Cromatografia gasosa	19
3.2 Análise quantitativa	20
3.2.1 Delineamento experimental.....	20
3.2.2 Método de fabrico	21
3.2.3 Infravermelho próximo.....	21
3.2.4 Análise quimiométrica	21

4.	Resultados e Discussão	22
4.1	Análise qualitativa.....	22
4.2	Cromatografia gasosa	28
4.3	Delineamento experimental para análise quantitativa	30
4.4	Confirmação qualitativa	30
4.5	Análise quantitativa	33
5.	Conclusão.....	43
6.	Perspetivas futuras.....	44
	Referências bibliográficas	45
	Anexos.....	50

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema da abordagem utilizada na dissertação.....	2
Figura 2 - Árvore de decisão sobre a nomenclatura das formulações tópicas(4).....	5
Figura 3 - Árvore de decisão na concessão de biowaivers para formulações tópicas(6).....	6
Figura 4 - Estrutura química do aciclovir (adaptado de (21)).....	7
Figura 5 - Ciclo de replicação do herpes vírus e local de ação dos agentes antivirais (adaptado de (21)).	8
Figura 6 - Mecanismo de ação do aciclovir em células infectadas pelo herpesvírus simples.....	9
Figura 7 - Estrutura química do polietilenoglicol(24).....	9
Figura 8 - Esquema de um equipamento de cromatografia gasosa (adaptado de (37))	12
Figura 9 – Exemplos de delineamentos experimentais	13
Figura 10 - Zonas de absorção no espectro de infravermelho próximo(53)	15
Figura 11 - Espectro de massa do branco, por ESI, para a janela de 100m/z - 700m/z.....	23
Figura 12 - Espectro de massa do PEG400 puro, por ESI, para a janela de 100m/z - 700m/z	23
Figura 13 - Espectro de massa do Aciclovir, por ESI, para a janela de 100m/z - 700m/z.....	23
Figura 14 - Espectro de massa do ensaio ACY116, por ESI, para a janela de 100m/z - 700m/z.....	23
Figura 15 - Espectro de massa do ensaio ACY117, por ESI, para a janela de 100m/z - 700m/z.....	24
Figura 16 - Espectro de massa do ensaio ACY119, por ESI, para a janela de 100m/z - 700m/z.....	24
Figura 17 - Espectro de massa do Lote 8072471, por ESI, para a janela de 100m/z - 700m/z.....	24
Figura 18 - Espectro de massa da matriz CHCA, por MALDI (janela de 100m/z – 700m/z)	26
Figura 19 - Espectro de massa do PEG3350 puro, por MALDI, para a janela de 700m/z - 5000m/z..	26
Figura 20 - Espectro de massa do PEG4000 puro, por MALDI, para a janela de 700m/z - 5000m/z..	26
Figura 21 - Espectro de massa do ensaio ACY115, por MALDI, para a janela de 700m/z - 5000m/z.	27
Figura 22 - Espectro de massa do ensaio ACY119, por MALDI, para a janela de 700m/z - 5000m/z.	27
Figura 23 - Espectro de massa do lote 8092267, por MALDI, para a janela de 700m/z - 5000m/z.....	27
Figura 24 - Cromatograma do ensaio ACY117 (PEG400+PEG3350+Propilenoglicol)	29
Figura 25 - Cromatograma do ensaio ACY119 (PEG400+PEG3350)	29
Figura 26 - Cromatograma do lote 8072471	29
Figura 27 - Cromatograma do lote 8094939	29
Figura 28 - Espectro de massa do ensaio ACY124, por ESI, para a janela de	32
Figura 29 - Espectro de massa do lote 8094939, por ESI, para a janela de	32
Figura 30 - Espectro de massa do ensaio ACY124, por MALDI, para a janela de.....	32
Figura 31 - Espectro de massa do lote 8094939, por MALDI, para a janela de	32
Figura 32 - Representação dos discos de PTFE utilizados	33
Figura 33 - Espectros NIR dos constituintes puros presentes na pomada obtidos por refletância difusa	33
Figura 34 - Espectros NIR dos constituintes puros presentes na pomada e dos ensaios do delineamento experimental obtidos por refletância difusa	34

Figura 35 - Primeira zona espectral de deslocamento.....	35
Figura 36 - Segunda zona espectral de deslocamento.....	35
Figura 37 - Terceira zona espectral de deslocamento.....	35
Figura 38 - Quarta zona espectral de deslocamento.....	35
Figura 39 - Quina zona espectral de deslocamento.....	35
Figura 40 - Sexta zona espectral de deslocamento.....	35
Figura 41 - Espectros NIR do aciclovir, do aciclovir em estufa a 50°C e do aciclovir em estufa a 70°C, obtidos por refletância difusa.....	36
Figura 42 - Espectros NIR dos ensaios ACY128 a ACY132 e do lote 8092267 obtidos por refletância difusa.....	37
Figura 43 - Representação gráfica dos espectros utilizados, com a exclusão das bandas correspondentes ao aciclovir nas pomadas.....	37
Figura 44 - Representação gráfica dos espectros utilizados após a aplicação do pré-processamento.....	38
Figura 45 - Dendrograma com os ensaios ACY128 a ACY 132 e pomadas de referência.....	39
Figura 46 - Dendrograma com os ensaios ACY128 a ACY 132 e lote 8092267.....	39
Figura 47 - Representação gráfica dos espectros utilizados, com a exclusão das bandas correspondentes ao aciclovir nas pomadas.....	40
Figura 48 - Representação gráfica dos espectros utilizados após a aplicação do pré-processamento.....	41
Figura 49 - Dendrograma com ensaios do DoE e pomadas de referência.....	42

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Configurações utilizadas nas análises por GC-MS.....	20
Tabela 2 - Programação do forno do cromatógrafo	20
Tabela 3 - Configurações utilizadas no DoE	20
Tabela 4 - Configurações utilizadas na aquisição dos espectros	21
Tabela 5 - Composição dos ensaios preparados para análise por ESI (Anexo A).....	22
Tabela 6 - Composição dos ensaios preparados para análise por MALDI (Anexo A)	25
Tabela 7 - Ensaios para análise quantitativa planeadas por delineamento experimental (Anexo A)...	30
Tabela 8 - Composição dos ensaios ACY128 a ACY132 (Anexo A)	36
Tabela 9 - Formulação final.....	42
Tabela 10 - Formulação final com base PEG comercial.....	42

Lista de Siglas e Abreviaturas

CHCA	Ácido α -ciano-4- hidroxicinâmico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DoE	Delineamento experimental
ESI	Ionização por electrospray
FT-NIR	Infravermelho próximo com transformada de Fourier
GC	Cromatografia gasosa
HCA	Análise de <i>grupos</i> hierárquica
HSV	Vírus <i>Herpes simplex</i>
MALDI	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz
MS	Espectrometria de massa
NIR	Infravermelho próximo
p.p.b	partes por bilhão
p.p.m	partes por milhão
PAT	Tecnologia analítica de processo
PEG	Poli(et)ilenoglicol
PTFE	Politetrafluoretileno (Teflon™)
Q1	Equivalência qualitativa
Q2	Equivalência quantitativa
Q3	Semelhança microestrutural
VZV	Vírus <i>Varicella-Zoster</i>

1. Introdução

Terminado o prazo de exclusividade conferido pela patente de um produto farmacêutico existe tipicamente uma diminuição gradual do preço de venda do produto, de modo a manter a sua competitividade no mercado, fruto do aparecimento em muitos casos do mercado de produtos genéricos.

Apesar dos progressos tecnológicos a maioria dos laboratórios farmacêuticos não possui uma metodologia integrada e sistemática para o desenvolvimento de produtos genéricos, desenvolvendo os seus produtos genéricos numa forte base empírica, numa base pouco sistemática, conduzindo a um grande consumo de recursos e de tempo.

A presente dissertação tem como finalidade apresentar um processo de desenvolvimento acelerado de genéricos através de metodologias expeditas, com o objetivo de fornecer uma abordagem mais direcionada ao seu desenvolvimento.

Este trabalho, fundamentado num problema da empresa Medinfar, tem como objeto de estudo o desenvolvimento de uma fórmula tópica para uma pomada de aciclovir baseada num produto de referência existente no mercado. Para resolver este problema foi criado um processo, utilizado nesta dissertação, a aplicar no desenvolvimento de formulações (Figura 1), consistindo em 5 fases: caracterização do produto de referência, análise qualitativa do produto de referência, desenvolvimento do método de fabrico; delineamento experimental e análise quantitativa de ensaios preparados, sendo, após estas fases, possível a definição de uma formulação final. A empresa já realizou diversos ensaios com diferentes bases de polietilenoglicol (PEG) descritas na bibliografia, sendo compostas por dois PEGs e com ou sem propilenoglicol. Devido à indefinição existente na bibliografia, à diferença entre resultados das análises e aos ensaios com os lotes de referência, foi sugerido o desenvolvimento deste produto, segundo a abordagem descrita anteriormente.

O produto desenvolvido consiste num semi-sólido, pelo que foi selecionada a seguinte abordagem: para a análise qualitativa utilizou-se espectrometria de massa (MS). Para averiguar a presença de propilenoglicol recorreu-se à cromatografia gasosa (GC). Em relação ao método de fabrico foi adaptado aquele já utilizado previamente pela empresa na realização de ensaios anteriores. Para a análise quantitativa foram produzidas amostras com base num delineamento experimental (DoE) e analisadas por espectroscopia no infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR), aplicando, posteriormente, uma análise de grupos para determinação das percentagens dos componentes presentes.

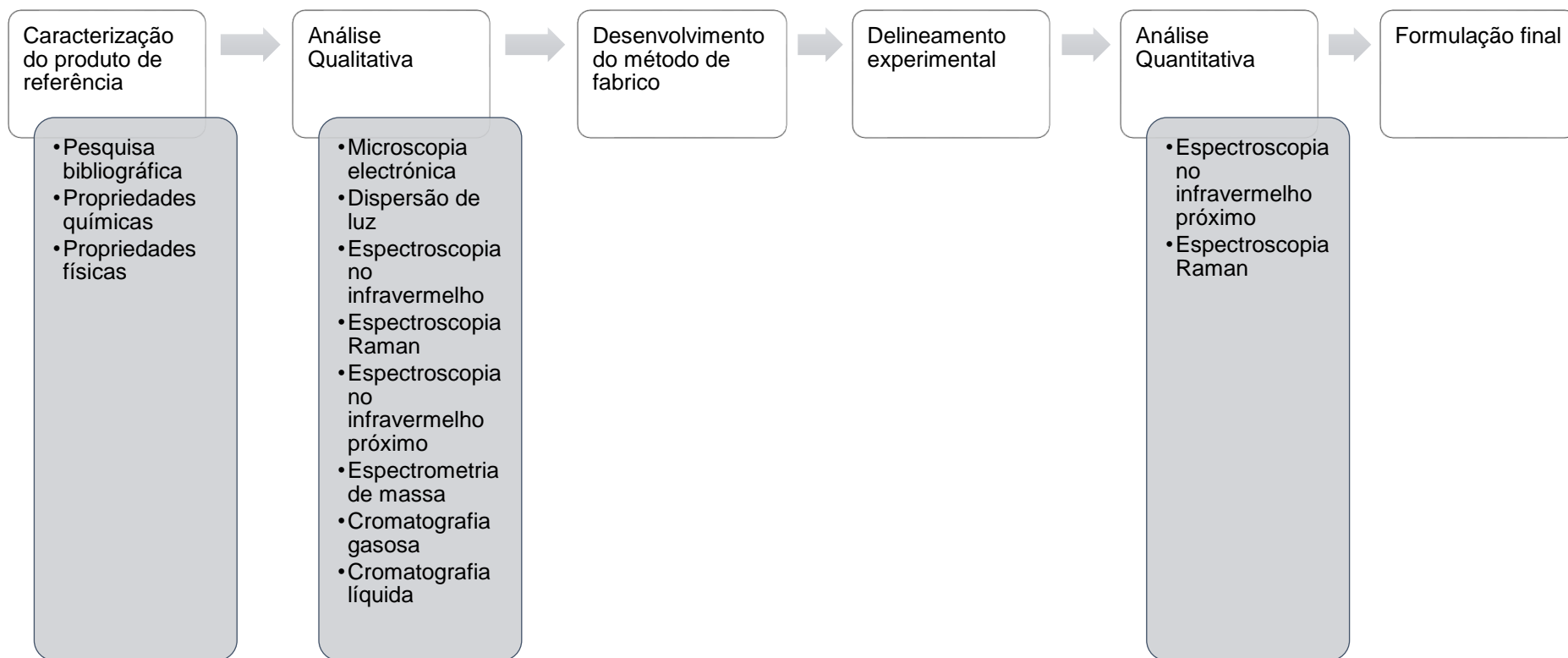


Figura 1 - Esquema da abordagem utilizada na dissertação

1.1 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento acelerado de uma formulação para uma pomada tópica de aciclovir, através de metodologias expeditas, sendo necessário cumprir os seguintes objetivos específicos:

- Analisar qualitativamente a pomada de referência;
- Averiguar a presença de propilenoglicol na pomada de referência;
- Desenvolver e/ou otimizar o método de fabrico;
- Analisar quantitativamente a pomada de referência;
- Apresentar uma formulação com base nos resultados obtidos.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Formulações tópicas

Existem várias formulações tópicas, entre as quais, pomadas, cremes, geles, espumas, aerossóis e pensos transdérmicos. As formulações tópicas semi-sólidas são as mais utilizadas (1), apresentando um comportamento reológico plástico, caracterizado pela capacidade de adesão à superfície mantendo a forma até que seja exercida uma força extrema, que por sua vez possibilita a deformação, aumentando a fluidez (2,3).

As pomadas são frequentemente constituídas por hidrocarbonetos líquidos inseridos numa matriz de hidrocarbonetos sólidos com ponto de fusão elevado. Maioritariamente, a matriz das pomadas é composta por parafina líquida ou a vaselina, sendo possível a utilização de outros componentes como a Plastibase(2). As matrizes constituídas por fusão de polietilenoglicóis podem resultar em produtos hidrossolúveis com a consistência de uma pomada, sendo preparadas por fusão simultânea dos componentes, sendo a substância ativa ou outros componentes adicionados no estado líquido. Numa pomada que contenha sólidos insolúveis é necessário um processo de moagem (num moinho coloidal, homogeneizador, ou misturador ultra-sónico) de forma a facilitar a dispersão ou dissolução dos ingredientes da base para formar uma pomada monofásica (2,3).

2.2 Desenvolvimento de formulações tópicas

Buhse et al.(2005)(4) desenvolveu um novo sistema e novas definições para determinar a nomenclatura apropriada a aplicar aos produtos tópicos (Figura 2) de forma a rotulá-los com precisão, porque existem produtos mais antigos descritos nas Farmacopeias baseados numa nomenclatura imprecisa, gerando uma rotulagem imprecisa dos produtos aprovados em relação à classificação atual. Por estes motivos torna-se essencial avaliar a lista de medicamentos de referência de forma crítica tendo em conta as propriedades químicas e físicas, impedindo que, no desenvolvimento de medicamentos genéricos, a rotulagem seja a única fonte a definir a forma tópica (1,4,5).

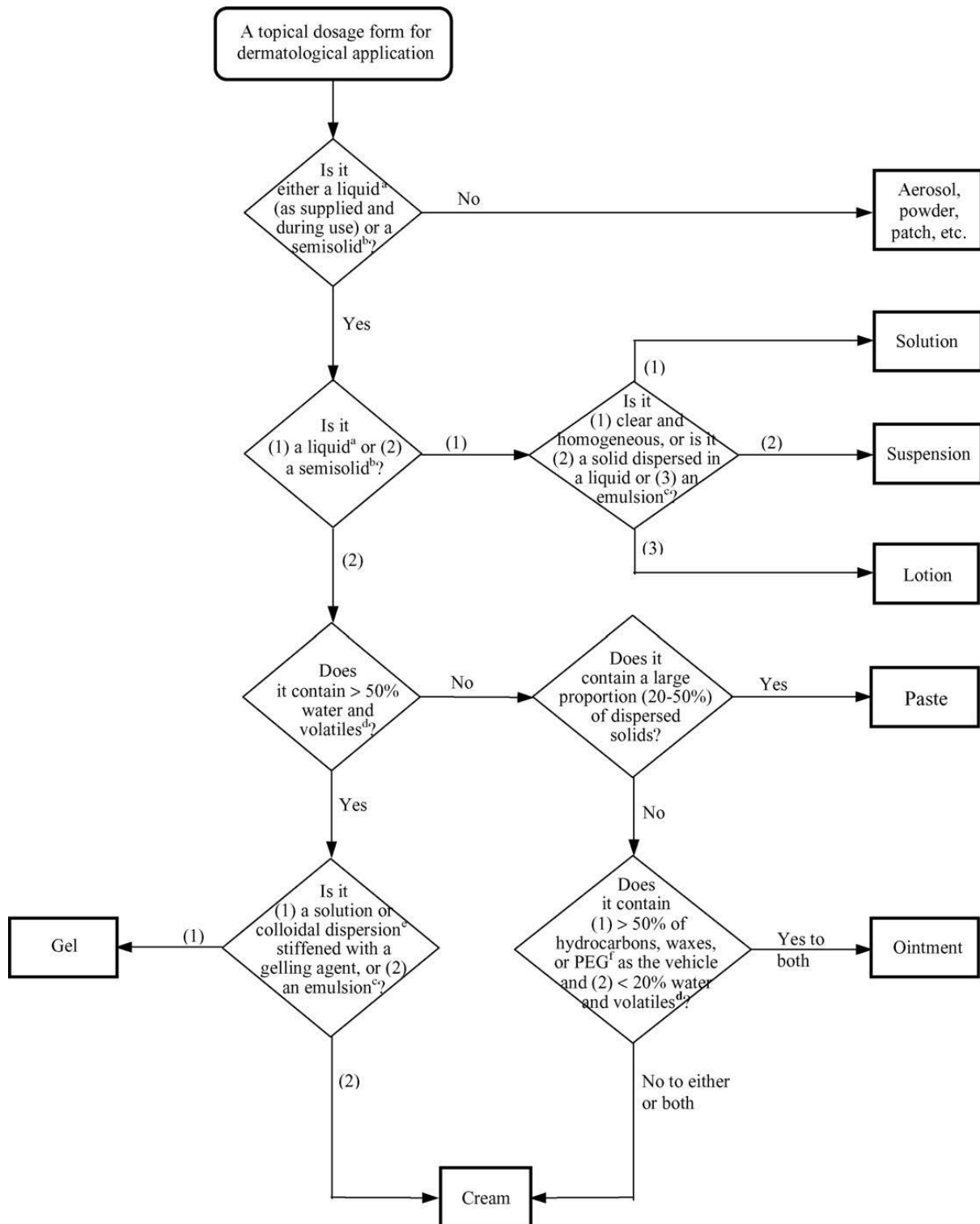


Figura 2 - Árvore de decisão sobre a nomenclatura das formulações tópicas(4)

Shad et al. (2015) propôs um sistema de classificação de formulações tópicas que pretende simplificar as condições normativas das formas farmacêuticas tópicas, baseado na equivalência qualitativa e quantitativa da composição (Q1 e Q2) e na similaridade das taxas de liberação *in vitro* (como avaliador da semelhança microestrutural, Q3) entre as formulações de um produto genérico e do produto de referência. Só se existir equivalência entre o produto genérico e o produto de referência relativamente aos três parâmetros, Q1, Q2 e Q3, é que o produto genérico pode ser adequado para

biowaiver. Caso contrário são necessários estudos adicionais ou a realização de um estudo *in vivo* de bioequivalência.

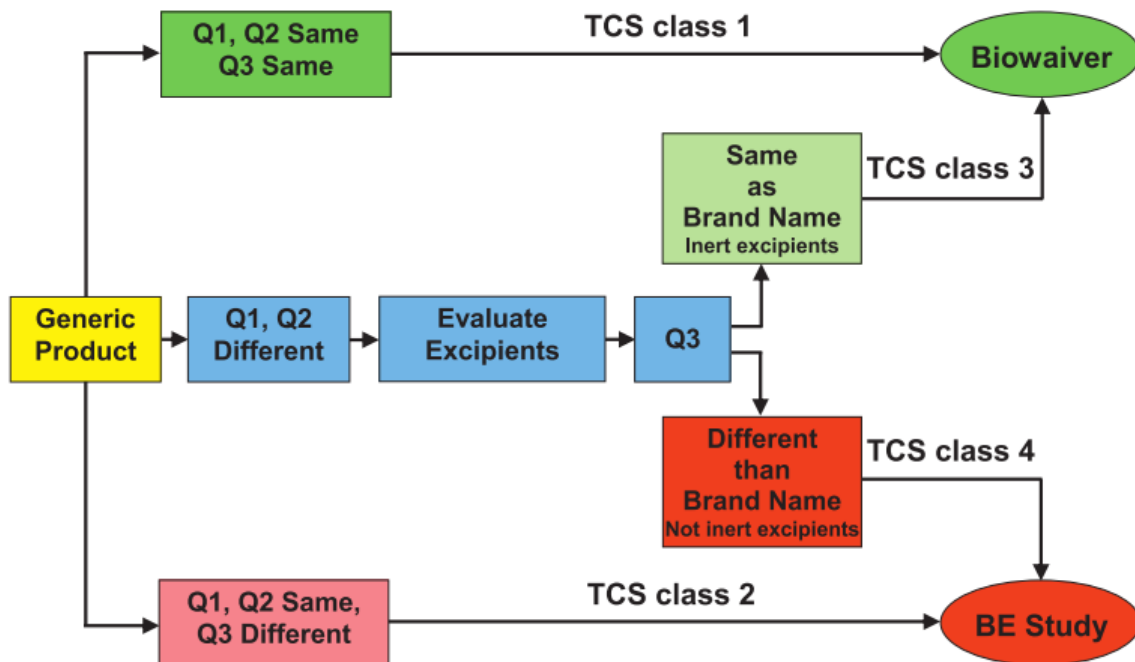


Figura 3 - Árvore de decisão na concessão de biowaivers para formulações tópicas(6)

De modo a atingir bioequivalência, os genéricos tendem a copiar os produtos de referência, usando as informações do folheto informativo, patentes e literatura referente ao produto, e dados adquiridos através de engenharia reversa, sendo o objetivo máximo no desenvolvimento de um produto genérico para aplicação tópica alcançar equivalência qualitativa (Q1), ou seja, conter os mesmos componentes que o produto de referência, e equivalência quantitativa (Q2), ou seja, conter os mesmos componentes na mesma concentração ($\pm 5\%$) que o produto de referência. Existe uma enorme vantagem ao desenvolver uma formulação que apresente equivalência Q1/Q2, porque a empresa pode, em algumas situações, ser dispensada de realizar estudos de bioequivalência *in vivo*, caso tenha dados de suporte que confirmem essa equivalência e que o produto desenvolvido exiba características físico-químicas semelhantes com o produto de referência(1,6–10). No entanto, para produtos semissólidos, não é obrigatório que o produto genérico apresente equivalência Q1/Q2, embora exista uma maior averiguação a nível regulamentar em formulações que não apresentem esta equivalência, obrigando a empresa a demonstrar que as características físico-químicas, os atributos críticos de qualidade e a taxa de fluxo do genérico (através de estudos de permeação da pele humana *in vitro* e/ou de absorção percutânea em modelos animais *in vivo*) são semelhantes aos do produto de referência(1,6,11–14).

Através de engenharia reversa, todos os potenciais problemas, tais como atributos críticos do produto, estabilidade e eficácia, podem ser minimizados, sendo que devido à proteção de patente ou a propriedades indesejáveis presentes na formulação do produto de referência, a empresa pode optar por reformular de modo a melhorar os atributos do produto, mas estas modificações precisam ser justificadas pela sua funcionalidade(1,15,16). A utilização de excipientes diferentes, qualitativamente

e/ou quantitativamente, deve ser justificado, exceto se apresentarem uma concentração $\leq 0,1\%$ do peso total do medicamento(1,16).

Durante o fabrico de preparações semissólidas pode ser necessário aplicar tratamentos adicionais como a desaeração por vácuo com agitação a velocidade reduzida para remoção das bolsas de ar. O tempo de homogeneização e a pressão de vácuo podem ser fatores críticos, afetando a estabilidade física e homogeneidade. As três principais variáveis no fabrico de preparações semissólidas são o tempo, a temperatura e a velocidade de agitação, sendo que os parâmetros do processo para estes três fatores inter-relacionados têm de ser identificados e controlados de modo a produzir lotes de qualidade consistente. Assim, para além dos excipientes utilizados, também o processo de fabrico tem impacto na cedência da substância ativa por parte da matriz, devido à influência deste na microestrutura da formulação, sendo necessário alcançar um arranjo de matéria semelhante ao do produto de referência (Q3), ou seja, os mesmos componentes na mesma concentração com a mesma disposição de matéria (microestrutura) em relação ao produto de referência, garantindo atributos de qualidade crítica semelhantes(1,6,10–12,17). A equivalência Q3 compreende que o genérico apresente uma reologia idêntica, tipo de emulsão e o mesmo estado físico da substância ativa no produto semi-sólido(1,6,7).

2.3 Caracterização do produto de referência

Segundo as informações disponíveis na cartonagem e folheto informativo, a pomada de referência destina-se à aplicação tópica e é composta por 5% (m/m) de aciclovir, sendo os restantes 95% uma base de polietilenoglicol(18,19). Relativamente ao tratamento, é aconselhado aplicar a pomada a cada 3 horas, 6 vezes por dia, durante 7 dias(18).

2.3.1 Caracterização da substância ativa

O aciclovir ($C_8H_{11}N_5O_3$) é um pó cristalino branco, com peso molecular de 225,2 Dalton e ponto de fusão aos 255°C. A solubilidade máxima em água é 2,5 mg/mL à temperatura de 37°C e os valores de pKa são de 2,27 e 9,25(18–20). Na Figura 4 está representada a sua estrutura molecular.

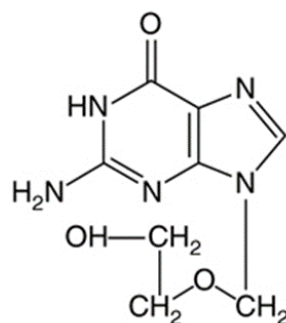


Figura 4 - Estrutura química do aciclovir (adaptado de (21))

O aciclovir é um análogo acíclico da guanina, sendo o valaciclovir o seu pró-fármaco. Clinicamente, a ação antiviral útil do aciclovir útil restringe-se aos herpes vírus, estando o ciclo de replicação

representado na Figura 5(18,21). O aciclovir *in vitro* é mais eficiente contra o HSV-1 do que comparativamente contra o HSV-2 ou o VZV. Porém, concentrações elevadas de aciclovir (> 50 µg/mL), geralmente, não comprometem o crescimento de células de mamíferos não infetadas(18,19,21).

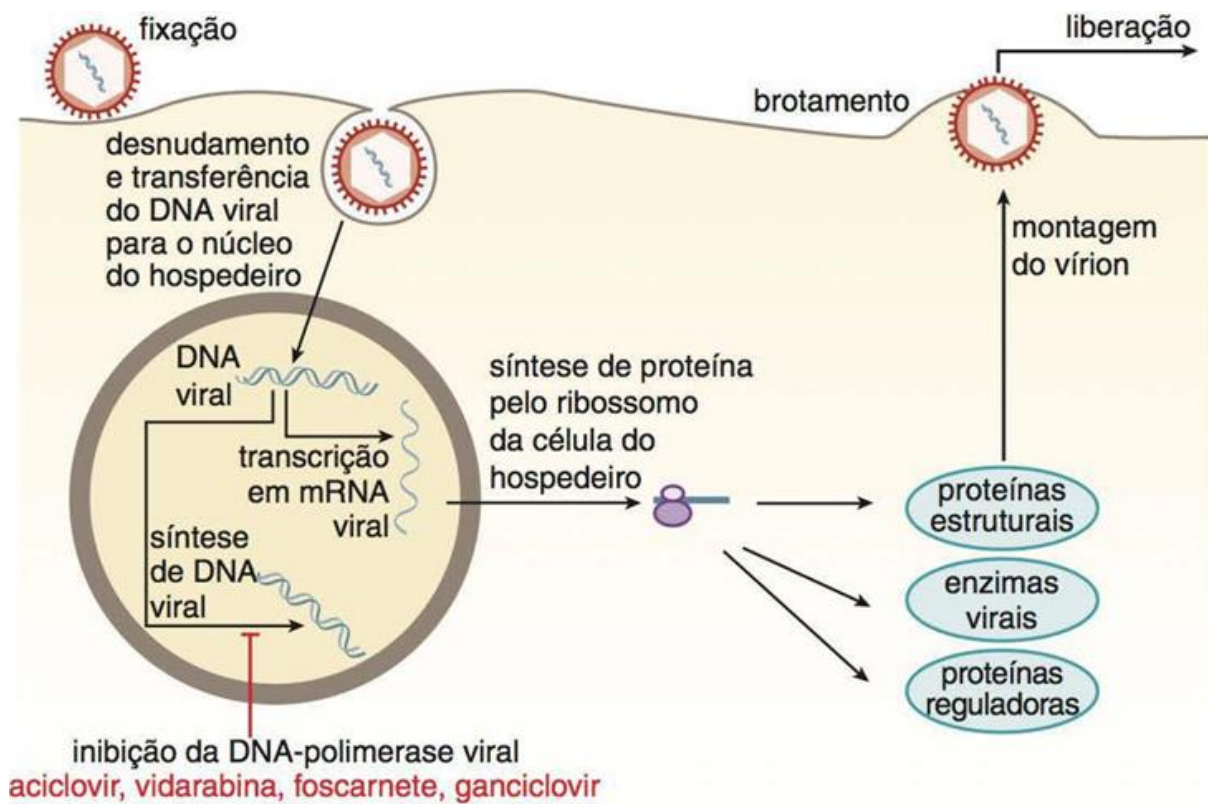


Figura 5 - Ciclo de replicação do herpes vírus e local de ação dos agentes antivirais (adaptado de (21)).

O mecanismo de ação do aciclovir encontra-se na Figura 6. Este mecanismo consiste na inibição da síntese de DNA viral através da interação com duas proteínas virais, a HSV timidinacina e a DNA-polimerase, sendo que a HSV timidinacina auxilia na captação celular e na fosforilação inicial do aciclovir devido à afinidade deste ser 200 vezes superior em relação à enzima presente nas células dos mamíferos(18,21).

Nas células existe competição entre o trifosfato de desoxiguanosina endógeno e o monofosfato em trifosfato de aciclovir, convertido pelas enzimas celulares que se encontra em concentrações 40-100 vezes superiores nas células infetadas pelo HSV(18,21).

Contudo existem casos de resistência do aciclovir ao HSV associados a três mecanismos: ausência ou produção parcial de timidinacina viral, alteração da especificidade do substrato da timidinacina e alteração da DNA-polimerase viral, sendo as mutações puntiformes e as inserções ou supressões de bases nos genes correspondentes responsáveis por estas alterações enzimáticas. Destes mecanismos, o mais comum consiste na ausência ou deficiência de atividade da timidinacina viral, enquanto que são raras as mutações na DNA-polimerase viral(18,19,21).

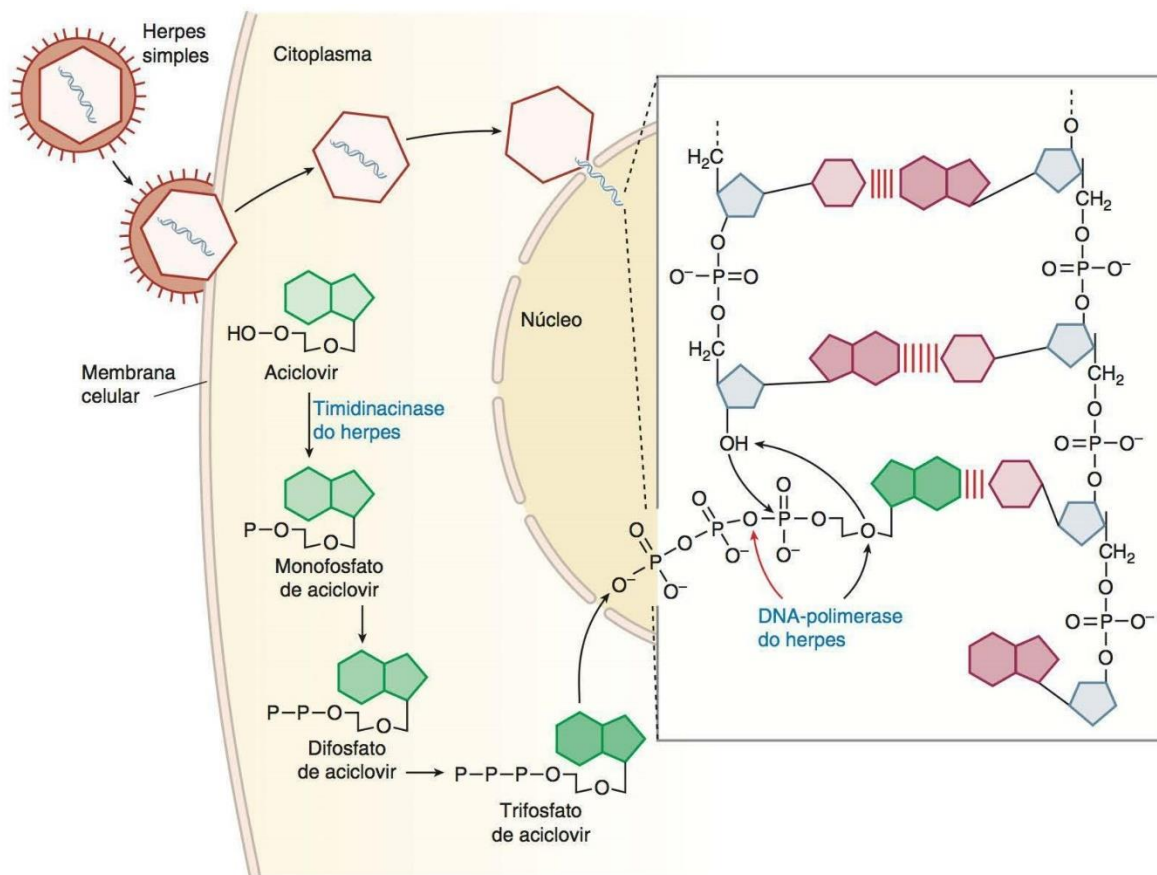


Figura 6 - Mecanismo de ação do aciclovir em células infectadas pelo herpesvírus simples

A administração tópica de aciclovir apresenta uma absorção percutânea reduzida. Em termos de efeitos adversos, o aciclovir é bem tolerado, mas quando inserido numa matriz de base de polietilenoglicol pode ocorrer irritação das mucosas e queimaduras transitórias em lesões genitais. Nas infecções labiais(22) e genitais recidivantes pelo herpesvírus simples, o creme tópico de aciclovir tem-se mostrado moderadamente eficaz, sendo que em pacientes com infecções labiais ou faciais muito localizadas, este ainda proporciona algum benefício(18,21,23).

2.3.2 Caracterização dos excipientes

O PEG é um polímero produzido através da junção de óxido de etileno e água, cuja fórmula está representada na Figura 7(24–27). Os PEGs com peso molecular médio entre 200 e 600 são líquidos à temperatura ambiente ligeiramente viscosos e transparentes. Os PEGs com peso molecular superior a 1000 são sólidos à temperatura ambiente de cor branca ou esbranquiçada e a sua consistência varia desde pastas a flocos cerosos, sendo que o PEG 6000 e superiores estão disponíveis em pó(24,25).

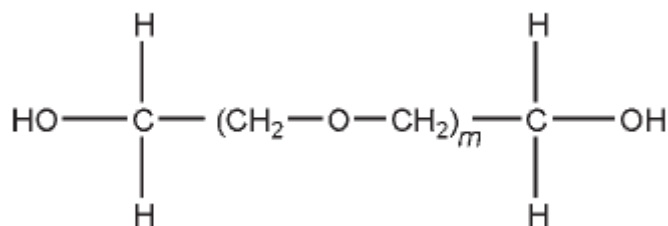


Figura 7 - Estrutura química do polietilenoglicol(24)

Os PEGs são amplamente utilizados nas formulações farmacêuticas, nomeadamente, formulações parentéricas, tópicas, oftálmicas, orais e rectais, tendo sido utilizado em matrizes poliméricas biodegradáveis para sistemas de libertação controlada. Os PEGs sólidos são geralmente utilizados em pomadas tópicas, sendo a sua consistência modificada através da adição de PEGs líquidos. Tratam-se de substâncias estáveis e hidrofílicas com dificuldade em penetrar na pele, essencialmente não irritantes para esta. No entanto, ocorrendo reações adversas estas manifestam-se através de picadas, especialmente quando aplicado a mucosas, urticária e reações alérgicas atrasadas, sendo os efeitos adversos mais graves a hiperosmolaridade, acidose metabólica e insuficiência renal em pacientes queimados pelo que preparações tópicas que contenham PEGs devem ser utilizadas com cautela em pacientes com insuficiência renal, queimaduras extensas ou feridas abertas(24,25,28).

2.4 Ionização por electrospray

A ionização por electrospray (ESI) foi considerada inicialmente como um método de ionização dedicado à análise de proteínas. Posteriormente, começou a ser usada também para a análise de polímeros, biopolímeros e pequenas moléculas polares, permitindo, ainda, alcançar uma alta sensibilidade, sendo fácil de se acoplar à cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), à micro cromatografia líquida de alto desempenho (μ HPLC) ou eletroforese capilar. A ESI pode ser usada em moléculas sem nenhum sítio ionizável através da formação de aductos de sódio, potássio, amônio, cloreto, acetato ou outros(29–31).

A ESI é concebida aplicando um campo elétrico forte, à pressão atmosférica, a um líquido que passa através de um tubo capilar com um fluxo fraco (de normalmente $1-10\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$). O campo elétrico é obtido através da aplicação de uma tensão de 3-6 kV entre o eléctrodo e o tubo capilar, separados por 0,3-2 cm, produzindo campos elétricos na ordem de $10^6\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$. O processo eletroquímico limita a corrente aplicada na ESI, sendo que esta é sensível à concentração, ao invés da quantidade total da amostra(29,31).

Este campo induz uma acumulação de carga no líquido superficial localizado no final do capilar, quebrando-se para formar gotículas altamente carregadas. Um gás, a baixo fluxo, é injetado coaxialmente, o que permite que a dispersão do spray seja limitada no espaço. Estas gotículas passam através de uma cortina de gás inerte aquecido (normalmente nitrogénio), ou através de um capilar aquecido para remover as últimas moléculas de solvente(29).

O spray começa com uma tensão inicial dependente da tensão superficial do solvente para uma determinada fonte. O solvente presente nas gotículas evapora-se e, conseqüentemente, faz com que estas encolham e a carga, por unidade de volume, aumente. Sob a influência de um forte campo elétrico, ocorre deformação da gota. Estas gotículas pequenas e altamente carregadas continuarão a perder solvente e quando o campo elétrico superficial for grande o suficiente ocorrerá a dessorção de íões da superfície. As cargas em excesso acumulam-se na superfície da gota. Na massa, os analitos e os eletrólitos, cujas cargas positivas e negativas são iguais em número, estão presentes numa concentração um pouco maior do que na gota do precursor. A dessorção de moléculas carregadas ocorre a partir da superfície, o que significa que a ESI apresenta uma maior sensibilidade para os

compostos cuja concentração na superfície é maior. Quando as misturas de compostos são analisadas, aqueles que se encontram à superfície das gotículas podem mascarar completamente a presença de compostos mais solúveis no solvente(29).

Quando a gota apresenta moléculas muito grandes, ocorre a libertação das mesmas quando o peso molecular dos compostos exceder 5000 a 10000 Dalton. Os iões obtidos a partir de moléculas grandes carregam um número superior de cargas, caso apresentem vários locais ionizáveis. Moléculas mais pequenas (menos de 1000 Da) geram principalmente iões monovalentes(29,31).

2.5 Ionização por dessorção a laser assistida por matriz

A ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) foi introduzido em 1988. Desde então, tornou-se uma fonte generalizada e poderosa para a produção de iões em fase gasosa intactos de elevada massa, como proteínas, polímeros sintéticos e grandes compostos inorgânicos. Caracteriza-se por ser um método de fácil preparação de amostras e com uma grande tolerância à contaminação por sais, detergentes, etc. O uso de uma matriz proporciona adsorção e ionização das amostras e representa um fator crucial no sucesso deste método de ionização(29,32–36).

O MALDI baseia-se em duas etapas. Na primeira etapa, o composto a analisar é dissolvido num solvente contendo em solução pequenas moléculas orgânicas, denominadas de matriz. Essas moléculas apresentam uma forte absorção ao comprimento de onda do laser. Esta mistura é seca antes da análise e qualquer solvente líquido utilizado na preparação da solução é removido. As moléculas de analito são embebidas completamente na matriz de forma a que estas moléculas estejam completamente isoladas umas das outras(29,32–36). Na segunda etapa, a matriz no estado sólido, é colocada dentro do espectrómetro de massa, sujeita a pulsos de laser de curta duração, ocorrendo a adsorção, sublimação dos cristais da matriz e expansão da matriz numa fase gasosa, ocorrendo transferência de iões acelerados por um campo electrostático em direcção ao analisador(29,32–36).

O MALDI caracteriza-se por ser mais sensível que outras técnicas de ionização a laser. O número de moléculas da matriz supera bastante o do analito, permitindo a separação das moléculas de análise e prevenindo a formação de aglomerados da amostra, que inibem a formação de iões moleculares. A matriz também minimiza o dano na amostra causado pelo pulso laser, absorvendo a maior parte da energia incidente e aumentando a eficiência da transferência de energia do laser para o analito, o que faz com que a sensibilidade também seja aumentada. Para além das características apresentadas anteriormente, o MALDI é mais universal que as outras técnicas de ionização a laser, uma vez que não é necessário ajustar o comprimento de onda para combinar a frequência de absorção de cada analito, porque é a matriz que absorve o pulso laser. Além disto, como o processo é independente das propriedades de absorção e do tamanho do composto a ser analisado, o MALDI permite a adsorção e ionização de analitos com uma massa molecular elevada, superior a 100000 Dalton(29,32–36).

2.6 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa é uma das técnicas de separação mais usadas para análise de gases, líquidos voláteis e sólidos, tendo sido descrita por Martin e James em 1952. Esta técnica consiste em volatilizar a amostra no injetor, separar os componentes das misturas numa coluna e deteção de cada

componente por um detetor. Ao longo dos anos foram introduzidas melhorias neste sistema, apesar de os componentes básicos permanecerem os mesmos. Destaca-se a introdução da coluna tubular aberta em 1958 por Golay e Desty e em 1979 a introdução de colunas capilares de sílica fundida por Dandeneu e Zerenner. Estas colunas permitiram resolver muitos problemas analíticos como a análise de misturas complexas de amostras biológicas, de produtos naturais e a separação isométrica(37,38).

O sistema de cromatografia gasosa consiste num sistema de abastecimento de gás inerte como fase móvel, passando pelo injetor, arrastando a amostra para a coluna onde ocorre a separação. Este sistema apresenta um forno com termostato para a coluna, um detetor que regista a presença de substâncias no efluente da coluna e um sistema de dados que permite gravar, apresentar e avaliar o cromatograma (Figura 8)(37,38).

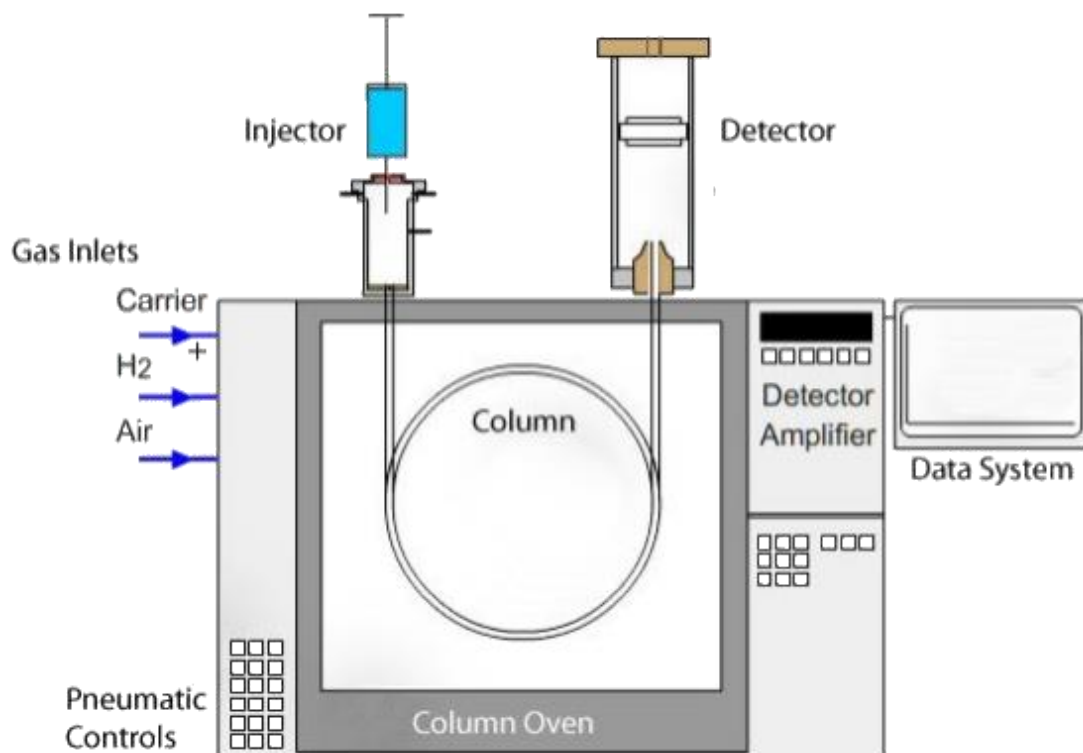


Figura 8 - Esquema de um equipamento de cromatografia gasosa (adaptado de (37))

Ao longo do tempo foram desenvolvidos vários sistemas de GC, que introduziram sistemas eletrônicos e informáticos de processamento e controlo permitindo, o processamento dos dados, controlo e automatização do processo. Para o GC se tornar uma técnica mais favorável contribuíram também sistemas com combinações de colunas de separação altamente eficientes e detetores específicos ou seletivos, como o detetor de captura de eletrões, MS e infravermelho com transformada de Fourier(37,38).

2.7 Delineamento experimental

O delineamento experimental (DoE) é um método usado para conceção eficiente de experiências. No contexto deste projeto, o método procura responder de uma forma sistemática a questões

específicas relacionadas, por exemplo, a problemas que surjam na produção, desenvolvimento ou pesquisa de um produto através de dados qualitativos e quantitativos. Este método propõe que para se poder planejar as experiências de forma eficiente é necessário(39–42):

- Definir o problema
- Definir as variáveis experimentais
- Definir os dados a serem obtidos

Após serem definidas as gamas de valores a que as variáveis serão submetidas, sendo que esta gama de valores é definida com maior facilidade quanto maior for o conhecimento sobre o sistema, escolhe-se um dos diferentes delineamentos experimentais existentes (Figura 9)(39–42).



Figura 9 – Exemplos de delineamentos experimentais

Apesar de qualquer um dos delineamentos experimentais ser muito útil, estes variam na capacidade de caracterizar os efeitos da interação entre as diversas variáveis, bem como o número total de amostras necessárias, devido à realização de replicados de amostras, normalmente da amostra com os valores médios (ponto central), e à presença ou ausência de pontos centrais. O DoE, ao indicar as experiências a executar, sugere aleatoriedade em termos da ordem de preparação destas permitido assim, a diminuição de erros sistemáticos(39–42).

2.8 Espectroscopia de infravermelho próximo

Em 1800, o cientista britânico William Herschel, enquanto registrava a porção de calor de cada cor constituinte da luz solar descobre a região NIR. A espectroscopia NIR permite obter um espectro com informação, qualitativa e quantitativa, relativamente aos aspetos físicos e químicos. Este espectro apresenta uma enorme valência quando utilizado com ferramentas matemáticas de análise multivariada de dados. Para além disto é uma ferramenta útil na construção de bases de dados com os atributos de processos e de produtos(41,43–50).

Inicialmente, o potencial desta técnica não foi reconhecido pela indústria farmacêutica, mas sim, pela indústria agroalimentar, tendo-se verificado um avanço significativo na implementação desta técnica como método de controlo de processos e de análise de qualidade industrial, através do desenvolvimento de novos formatos de sondas com base em fibra ótica e em introdução de técnicas quimiométricas(41,43,44).

A espectroscopia NIR só começou a ser utilizada na indústria farmacêutica recentemente como forma de monitorizar processos, controlar a qualidade dos produtos e como método de análise de matérias-primas(41,43,44).

O despertar do interesse por esta técnica por parte da indústria farmacêutica resulta principalmente da vantagem que a monitorização NIR (técnica não invasiva de análise) apresenta relativamente a outras técnicas, uma vez que elimina a necessidade de preparação de amostras, de pessoal qualificado para as executar e reduzindo significativamente os tempos de análise, apresentando-se também como uma técnica de análise analítica viável para a avaliação dos processos de mistura de pós, já que a grande maioria dos compostos com alguma relevância para a indústria farmacêutica têm sensibilidade à radiação NIR(41,43,44).

Atualmente, a espectroscopia é uma das tecnologias analíticas de processos (PAT) mais utilizada na indústria farmacêutica. Resumidamente a espectroscopia NIR apresenta as seguintes vantagens relativamente a outras técnicas(41,43,44):

- técnica não-destrutiva, rápida e precisa;
- não requer manipulação da amostra;
- baixo custo por análise;
- boa relação sinal-ruído;
- mecanicamente simples.

No espectro de infravermelho, as ligações dos grupos funcionais absorvem comprimentos de onda específicos. Esta absorção advém de movimentações moleculares (flexões e torsões) e mudanças de estados vibracionais. Um composto apresenta um espectro de absorção no espectro de infravermelho sempre que a radiação incidente na molécula do composto provoque o excitação dos modos vibracionais e a sua energia corresponda à diferença de dois níveis energéticos vibracionais (excitado e fundamental), existindo dois modos vibracionais: vibrações de alongamento e vibrações de deformação, sendo que nas vibrações de alongamento, os átomos movem-se no mesmo eixo da ligação, modificando o comprimento da ligação e nas vibrações de deformação, há modificação do ângulo de ligação entre os átomos. Observa-se que para moléculas com vários grupos funcionais a frequência de absorção para um grupo individualizado é constante, possibilitando o desenvolvimento de tabelas de correspondência entre as frequências características de absorção de cada grupo funcional (Figura 10)(41,43,44,51,52).

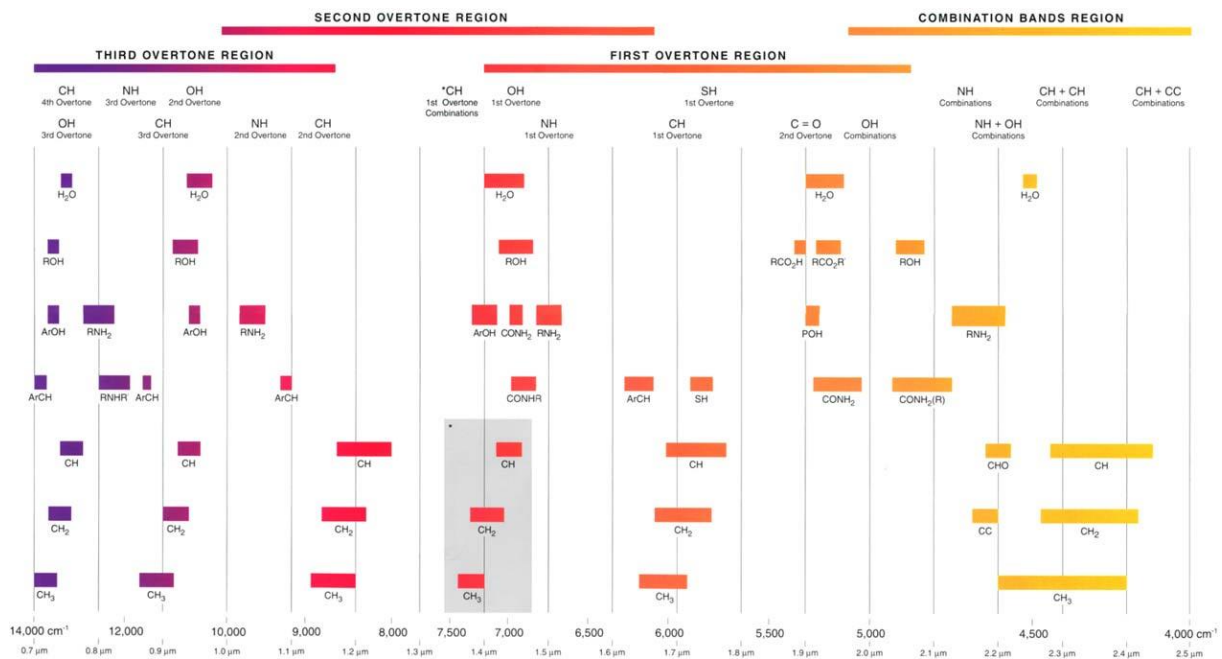


Figura 10 - Zonas de absorção no espectro de infravermelho próximo(53)

Como forma de acelerar o processo de digitalização, foi desenvolvida a espectroscopia com aplicação da transformada de Fourier. A colocação de um interferômetro possibilita medir a intensidade do sinal na ordem de um segundo ou mais na produção de um sinal singular com todas as frequências do espectro de infravermelho. Com isto, o tempo de análise de uma amostra é reduzido de vários minutos para uns meros segundos. A radiação que sai do interferômetro é posteriormente direcionada para o detetor, medindo a fração de energia que transpôs a amostra em cada frequência, originando o interferograma. O interferograma corresponde a um gráfico que contém as frequências e as características do espectro (intensidade vs. frequência). Após ser gerado o interferograma é aplicada a transformada de Fourier. Esta operação matemática é executada por um microprocessador presente no espectrofotômetro ou por um computador associado externamente ao aparelho. Após o processamento do interferograma são apresentados os valores de intensidade da energia absorvida distribuída por cada comprimento de onda(41,43,44,49,52–55).

Os espectrómetros NIR permitem essencialmente efetuar leituras nos seguintes modos:

- modo de transmitância
- modo de refletância difusa.

Neste projeto foi utilizado o método de análise por refletância difusa (radiação devolvida em todos os ângulos – ou seja, radiação difusa). Na refletância difusa após incidência de radiação na amostra, parte da radiação é absorvida e a outra parte (não absorvida) é refletida de volta. Este método devolve informações sobre as características físicas e químicas da amostra e é comum ser utilizado na análise de sólidos e líquidos viscosos dado que cada molécula tem um espectro particular na região do infravermelho, tornando o método viável para reconhecer diferentes tipos de amostras (análise qualitativa). Para além disso é possível identificar no espectro as frequências vibracionais dos átomos que compõe uma amostra representados pela forma de picos ou sobreposição de picos, a intensidade

destes picos é correlacionável com a quantidade de alguns compostos (análise quantitativa). O valor de refletância (R) é definido pela Eq. 1.

$$R = \frac{I_R}{I_0} \quad (1)$$

Na Eq. 1 I_R o valor da intensidade da luz refletida e I_0 o valor da intensidade da luz incidente(41,43,44,49,52–55).

2.9 Quimiometria

A quimiometria é uma ferramenta que combina métodos estatísticos e conhecimentos químicos para análise de dados experimentais. A interação entre modelos multivariados e empíricos confere à quimiometria uma poderosa e perigosa capacidade de processamento, tendo a capacidade de atuar em sistemas cujo os modelos são desconhecidos e complexos, não estando restringidos por constrangimentos teóricos, sendo uma enorme vantagem caso o sistema sofra de variações amplas relativamente ao comportamento teórico conhecido. Contudo, a maioria das técnicas de modelação empíricas precisam de ser alimentadas por largas quantidades de dados com qualidade, sendo que os modelos empíricos desenvolvidos só podem ser aplicados com segurança nas mesmas condições que foram impostas aos dados usados na construção o modelo. A utilização de demasiadas variáveis de resposta na construção de modelos origina modelos superestimados, obtendo-se resultados artificialmente otimistas(39,41,44,56).

As ferramentas quimiométricas podem ser aplicadas em análise exploratória de dados, desenvolvimento de modelos preditivos ou delineamento experimental, tendo-se mostrado mais eficientes nas seguintes funções na especialização de instrumentos e na extração da informação(39,41,44,56).

Frequentemente, antes da construção de qualquer modelo com base em ferramentas quimiométricas, é necessário aplicar algum género de tratamento aos dados brutos(39,41,44,56). O pré-tratamento corresponde a qualquer manipulação de natureza matemática, aplicada aos dados brutos, antes de qualquer análise dos mesmos, reduzindo a influência de fontes indesejáveis como o ruído devido ao equipamento utilizado, ou amplificar as diferenças existentes nos dados, aumentando o desempenho do modelo. Ao aplicar pré-tratamento deve-se ter em consideração a probabilidade de se eliminar ou atenuar informações espectrais importantes. As técnicas que apresentam mais aceitação no pré-tratamento de dados de espectros NIR são(39,41,44,56):

- derivadas (Savitzky-Golay);
- variação de padrão normal (SNV);
- correção multiplicativa de sinal (MSC).

2.9.1 Derivadas (Savitzky-Golay)

Este pré-tratamento, como o nome indica, envolve a aplicação de derivadas a funções, sendo que neste caso o espectro de uma única amostra é tratado como uma função. No entanto, em quimiometria, normalmente utilizam-se derivadas com filtros Savitsky-Golay. Estes filtros são essencialmente funções locais, aplicadas a cada espectro numa janela móvel de largura e resoluções definidas, em todo o eixo do comprimento de onda/número de onda, de modo a calcular a derivada em cada um destes pontos do espectro(39,41,44).

A utilização de 1ª derivada em espectroscopia é muito eficaz como pré-tratamento, eliminando as variações de desvio da linha de base do espectro, sendo bastante comum existir desvios de linha de base espectral entre amostras. A 2ª derivada, bastante comum na espectroscopia de refletância difusa NIR, traduz-se na eliminação das diferenças de desvio de linha de base entre os espectros e diferenças nas inclinações da linha de base entre os espectros, sendo que existe o risco de o ruído espectral ser amplificado, devendo ser aplicada apenas a zonas muito restritas do espectro. As derivadas podem ser aplicadas a uma única amostra (espectro) de cada vez, ao contrário dos pré-tratamentos de centrado na média e autocorreção, onde é necessário, no mínimo, duas amostras(39,41,44).

2.9.2 Aglomeração hierárquica

A análise hierárquica de grupos (HCA) consiste num algoritmo usado para agrupar objetos de acordo com um conjunto de dados que os caracterizam. (39,57). Antes de se utilizar um determinado algoritmo de HCA é necessário definir o espaço de classificação e a medida de distância (Euclideana, de Mahalanobis, etc.) e, para além destes parâmetros, definir o método de agrupamento (aglomerativo ou divisivo). O método de agrupamento define qual a medida de distância a ser utilizada no algoritmo.

Existem diversos métodos de agrupamento, sendo alguns deles(39,57) listados seguidamente.

- Vizinho mais próximo – utiliza a distância entre as duas amostras mais próximas de diferentes agrupamentos. Este método tende a gerar grupos “alongados” no espaço de classificação.
- Vizinho mais distante – utiliza a maior distância entre quaisquer duas amostras de diferentes agrupamentos. Este método tende a gerar agrupamentos “arredondados” no espaço.
- Média do grupo de pares – utiliza a distância média entre todos os pares possíveis de amostras nos dois agrupamentos. Este método requer mais tempo de computação, no entanto é igualmente apropriado nos casos em que os agrupamentos de amostras naturais são “alongados” ou “arredondados”.
- Centroide: a distância entre dois grupos é definida como a diferença da média multivariada (centroide) de cada grupo, sendo unidos os dois grupos com a distância mínima.
- Média: igual ao centroide mas utilizando médias multivariadas ponderadas pelo número de objetos em cada grupo.
- Método de Ward: este método não calcula os centros dos agrupamentos. O agrupamento é feito através da junção de dois grupos de objetos existentes, de modo que a variável agrupada dentro do grupo resultante seja minimizada.

O algoritmo HCA utilizando o método de Ward começa por atribuir a cada amostra o seu próprio grupo. De seguida, usa o método de agrupamento pré-definido para encontrar e juntar os dois grupos mais próximos num só grupo. Este procedimento é repetido até que seja atingido um número pré-definido de grupos ou seja atingido um único grupo, sendo esta condição de paragem definida pelo objetivo da análise(39,57).

Os dois formatos mais utilizados para apresentar os resultados de um HCA são o dendrograma ou o gráfico de dispersão das amostras no espaço de classificação(39). A apresentação sobre a forma de dendrograma torna-se útil caso o resultado do algoritmo apresente um único grupo ou um número pré-determinado de grupos. Esta forma de apresentação fornece ao utilizador informações sobre os subconjuntos de amostras que se agrupam e as distâncias limite em que cada amostra se junta a um grupo(39). O gráfico de dispersão das amostras no espaço de classificação apresenta-se mais limitado, apesar deste gráfico fornecer informações sobre as amostras agrupadas e as distâncias entre grupos. A sua utilização só é revelante caso o resultado do algoritmo tenha um número pré-determinado de grupos. Para além disto, nos casos em que existem mais do que duas variáveis de entrada (ou seja, mais do que duas dimensões no espaço de classificação), este gráfico apenas consegue apresentar agrupamento de amostras com duas dimensões de cada vez(39).

3. Materiais e métodos

3.1 Análise qualitativa

Para a análise qualitativa da base PEG utilizou-se MS e para averiguar a presença de propilenoglicol utilizou-se MS e GC-MS.

3.1.1 Espectrometria de massa (ESI)

O equipamento utilizado foi um espectrômetro de massa tripló quadrupólo Micromass Quattro Micro API™ (Waters Corporation, Milford, MA), com uma fonte ESI acoplada. A aquisição dos espectros foi efetuada em modo positivo para a janela de massas inferior a 700 m/z, sendo que para a detecção de propilenoglicol também foi utilizado o modo negativo.

As amostras foram preparadas com uma concentração de 1mg/mL em acetonitrilo e filtradas por um filtro uma malha de PTFE de abertura 0,22µm. Antes da análise, as amostras foram diluídas em acetonitrilo até obter-se a concentração de 100µg/mL.

3.1.2 Espectrometria de massa (MALDI)

O equipamento utilizado foi um espectrômetro de massa 4800 Plus MALDI TOF/TOF™ (SCIEX, Concord, Ontário). A aquisição dos espectros foi efetuada em modo refletor positivo para a janela de massas de 700 m/z – 5000 m/z. As amostras foram diluídas numa matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), com uma concentração de 10 mg/mL, dissolvida em 50% de acetonitrilo / 0.1% de ácido trifluoroacético.

3.1.3 Cromatografia gasosa

As amostras foram preparadas com uma concentração de 50 mg/mL em metanol, adicionando 0,10 mg/mL de 2,2,2-tricloroetanol como padrão interno e a solução-padrão foi preparada com 2.0 mg/mL de propilenoglicol em metanol, adicionando 0,10 mg/mL de 2,2,2-tricloroetanol como padrão interno(58). Todas as amostras preparadas foram filtradas por um filtro com malha de PTFE de abertura 0,22µm. Utilizou-se uma coluna ZB 5-MS, Zebron, 30 m (comprimento) x 0,25 mm (diâmetro interno) x 0,25 µm (espessura da película) acoplada a um detetor de ionização de chama, sendo apresentado na Tabela 1 as configurações utilizadas na análise.

Tabela 1 - Configurações utilizadas nas análises por GC-MS

Parâmetro	Condição aplicada
Volume de injeção	1 µL
Gás de arraste	Hélio
Fluxo de arrasto	2 mL/min
Temperatura do injetor	250°C
Modo de injeção	Splitless (1.5 min)
Proporção	1/50
Temperatura da fonte iônica	250°C
Temperatura do detetor	250°C
Tempo de análise	16 min

Na Tabela 2 encontra-se descrito a programação do forno do cromatógrafo.

Tabela 2 - Programação do forno do cromatógrafo

Taxa (°C / min)	Temperatura final (°C)	Tempo de retenção (min)
	35.0	5.00
35.00	200.0	1.00
35.00	325.0	10.00

3.2 Análise quantitativa

Para a análise quantitativa foi realizado um delineamento experimental, seguindo-se aquisição dos espectros NIR das amostras produzidas e de referência, terminando com a sua análise quimiométrica.

3.2.1 Delineamento experimental

O DoE foi realizado utilizando o software MODDE (Versão 12, MKS Instruments AB, Umeå, Suécia). Na Tabela 3 são apresentadas as configurações utilizadas no DoE.

Tabela 3 - Configurações utilizadas no DoE

Parâmetro	Condição aplicada
Fatores	3
Respostas	---
Objetivo	Análise exploratória
Delineamento	Fatorial Completo (2 níveis)
Modelo	Interação
Experiências do delineamento	4
Pontos centrais	3
Réplicas do delineamento	0
Total de experiências	7

Neste caso, tratando-se de uma formulação com poucos componentes, foi utilizado um DoE do tipo fatorial completo, com replicação do ponto central, sendo que as variáveis variaram em termos de proporção presente de cada constituinte.

3.2.2 Método de fabrico

O método de fabrico utilizado teve como base o protocolo anteriormente utilizado pela Medinfar Ressalvar que o método de fabrico aqui descrito será abordado em traços gerais, devido a questões de ordem confidencial, apesar de se ter procedido à otimização deste método e à identificação dos parâmetros críticos de produção. Assim sendo, o processo de fabrico traduz-se nos seguintes passos:

- 1) incorporar a substância ativa em parte do PEG de menor peso molecular;
- 2) juntar o restante PEG de menor peso molecular ao PEG de maior peso molecular e fundir;
- 3) juntar à mistura 1) a mistura 2);
- 4) deixar arrefecer até à temperatura ambiente e
- 5) acondicionar.

3.2.3 Infravermelho próximo

As configurações do equipamento utilizadas são apresentadas na Tabela 4. Foram analisadas as amostras obtidas do DoE, as pomadas de referência, assim como obtido o espectro de cada componente presente (informação obtida através da análise qualitativa).

Tabela 4 - Configurações utilizadas na aquisição dos espectros

Parâmetro	Condição aplicada
Modo	Refletância difusa
Detetor	Índio-Gálio-Arsénio (InGaAs)
Branco	PTFE
Resolução	8cm ⁻¹
Varrimentos	32
Janela espectral	10000cm ⁻¹ – 4000cm ⁻¹
Réplicas	Triplificados

3.2.4 Análise quimiométrica

A análise quimiométrica foi realizada utilizando o software MATLAB (Versão 8.3, MathWorks, Natick, MA) e PLS Toolbox (Versão 8.2.1, Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA).

4. Resultados e Discussão

4.1 Análise qualitativa

Foram obtidos espectros de massa de várias amostras com o intuito de identificar o(s) tipo de PEG(s) que compõe(m) a pomada. Estas amostras foram realizadas anteriormente na Medinfar, baseadas apenas na bibliografia existente. Foram também analisadas amostras de lotes do produto de referência, assim como das matérias-primas utilizadas na preparação das amostras realizadas anteriormente na Medinfar, para verificar o desempenho do método utilizado. Na Tabela 5 estão apresentados os ensaios para a análise por ESI.

Tabela 5 - Composição dos ensaios preparados para análise por ESI (Anexo A)

Ensaio	PEG400 [%]	PEG3350 [%]	PEG4000 [%]	Propilenoglicol [%]
ACY116	54,72	-	36,48	3,80
ACY117	54,72	36,48	-	3,80
ACY119	57,00	38,00	-	-

A ESI foi utilizada para identificar o PEG com razão massa-carga inferior a 700. Na Figura 11 encontra-se o espectro do branco, neste caso acetonitrilo, para as amostras analisadas por esta espectrometria de massa.

O espectro da Figura 12 é referente ao PEG 400 puro. Verifica-se que a intensidade do conjunto de picos situados na zona 200m/z-600m/z apresentam conformação semelhante a uma distribuição normal e a diferença de massa molecular entre estes é constante em 44m/z, características intrínsecas a compostos poliméricos como o polietilenoglicol sendo o pico mais intenso desta distribuição em 459m/z. Todos os dados adquiridos neste espectro confirmam que o PEG presente tem uma massa molecular média de 400.

A Figura 13 apresenta o espectro relativo ao aciclovir. Verifica-se um pico mais intenso em 152m/z e um pico em 226m/z. Estes dois picos são característicos do aciclovir, confirmando a sua presença.

No ensaio ACY116 (Figura 14) verificam-se todas as condições referidas anteriormente. Contudo, nos ensaios ACY117 (Figura 15) e ACY119 (Figura 16), o pico mais intenso relativo ao PEG400 ocorre em 415m/z.

Em relação ao lote comercial 8072471 (Figura 17), verifica-se que a intensidade do conjunto de picos se situa entre 100m/z-500m/z, apresentando conformação semelhante a uma distribuição normal, sendo a diferença de massa molecular entre os picos constante em 44m/z. O pico mais elevado desta distribuição encontra-se em 327m/z. Contrariamente aos resultados obtidos nas amostras preparadas, todos os dados adquiridos no espectro do lote comercial indicam que o PEG utilizado apresenta uma massa molecular média de 300.

No anexo B encontram-se as ampliações dos espectros presentes nesta secção.

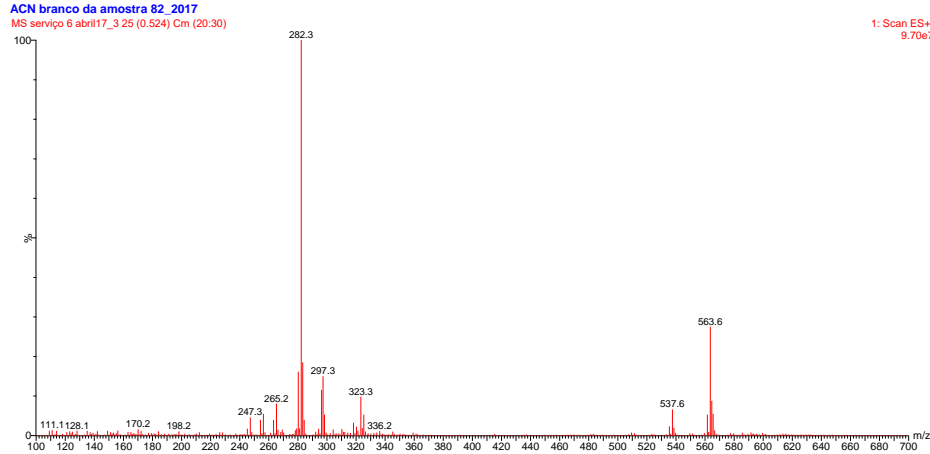


Figura 11 - Espectro de massa do branco, por ESI, para a janela de 100m/z - 700m/z

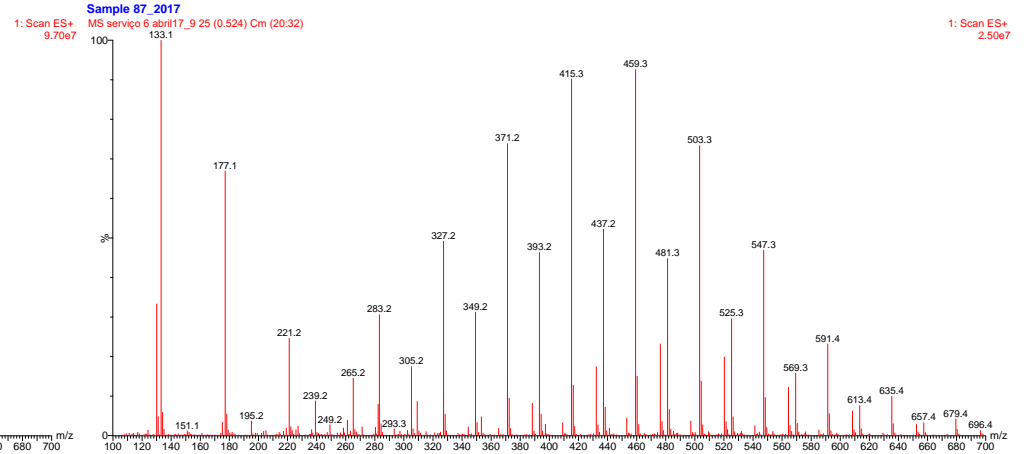


Figura 12 - Espectro de massa do PEG400 puro, por ESI, para a janela de 100m/z - 700m/z

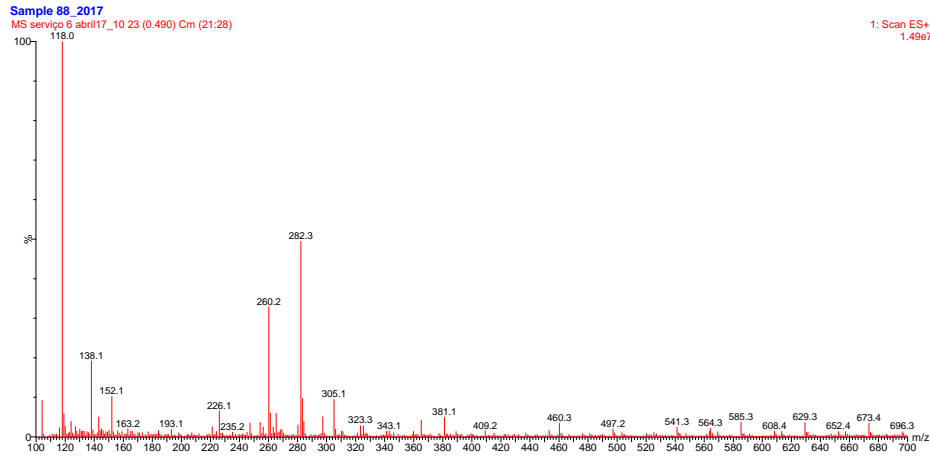


Figura 13 - Espectro de massa do Aciclovir, por ESI, para a janela de 100m/z - 700m/z

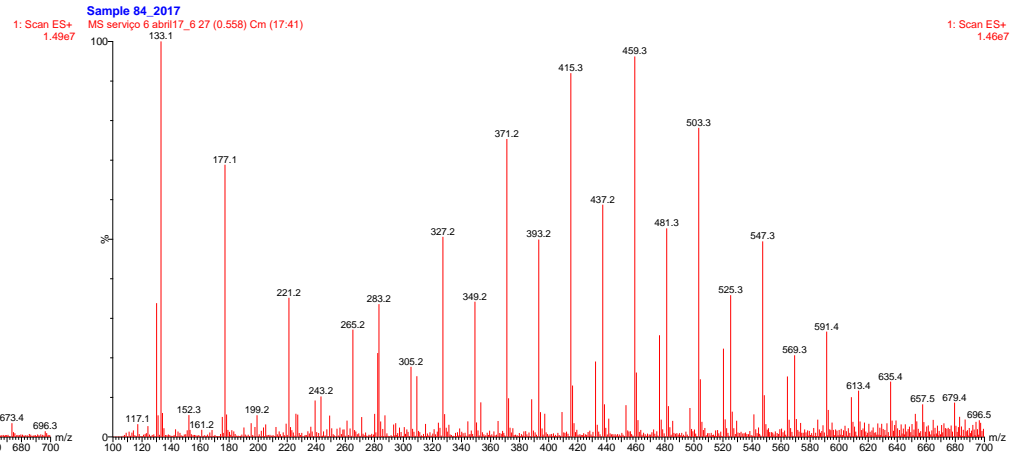


Figura 14 - Espectro de massa do ensaio ACY116, por ESI, para a janela de 100m/z - 700m/z

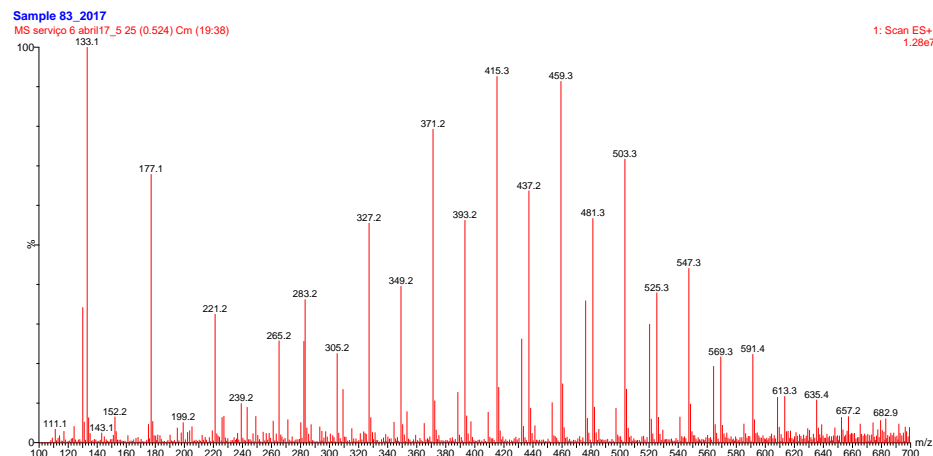


Figura 15 - Espectro de massa do ensaio ACY117, por ESI, para a janela de 100m/z - 700m/z

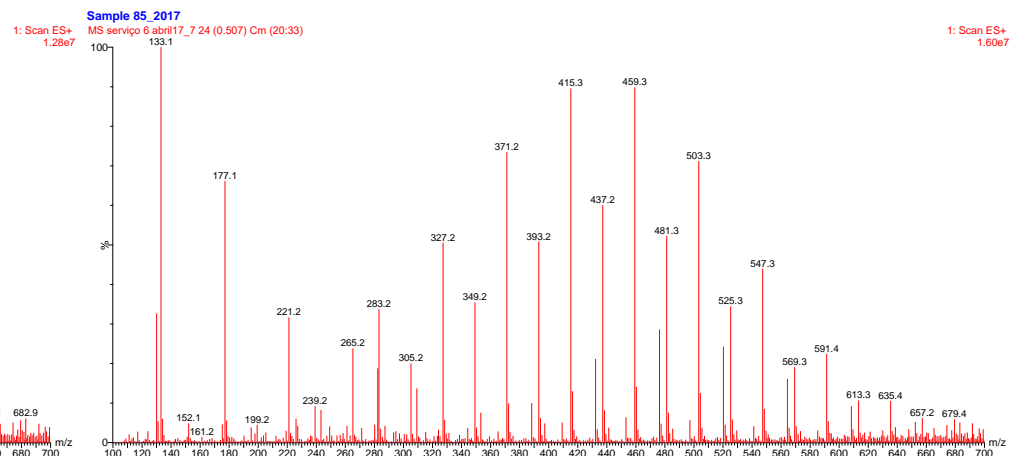


Figura 16 - Espectro de massa do ensaio ACY119, por ESI, para a janela de 100m/z - 700m/z

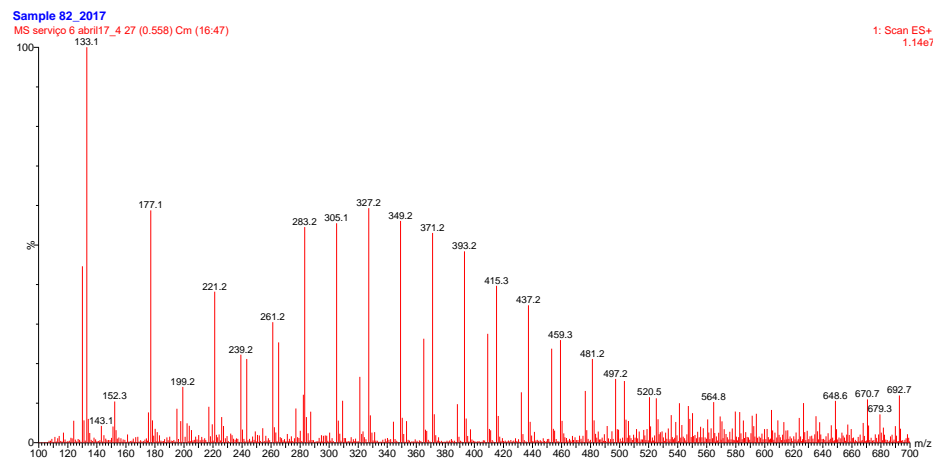


Figura 17 - Espectro de massa do Lote 8072471, por ESI, para a janela de 100m/z - 700m/z

Por sua vez, a MALDI foi utilizada para identificar o PEG com razão massa-carga superior a 700. Na Figura 18 encontra-se o espectro de massa da matriz utilizada para análise, encontrando-se na Tabela 6 os ensaios utilizados. Como a zona de ionização desta matriz fica situada em razões massa-carga inferiores a 700, não existe interferência desta com as análises realizadas.

Tabela 6 - Composição dos ensaios preparados para análise por MALDI (Anexo A)

Ensaio	PEG400 [%]	PEG3350 [%]	PEG4000 [%]	Propilenoglicol [%]
ACY115	57,00	-	38,00	-
ACY119	57,00	38,00	-	-

A intensidade do conjunto de picos do PEG3350 puro (Figura 19), situados entre 2300m/z-4300m/z, apresentam conformação semelhante a uma distribuição normal e a diferença de massa molecular entre estes é constante em 44m/z, sendo o pico mais intenso desta distribuição em 3431m/z. Todos os dados adquiridos neste espectro confirmam que o PEG presente tem uma massa molecular média de 3350.

Relativamente ao PEG4000 (Figura 20) confirma-se que a intensidade do conjunto de picos, situados entre 3000m/z-5000m/z, apresentam conformação semelhante a uma distribuição normal e a diferença de massa molecular entre estes é constante em 44m/z, sendo o pico mais intenso desta distribuição em 3959m/z, confirmando que o PEG presente tem uma massa molecular média de 4000.

O espectro do ensaio ACY115 (Figura 21) confirma a presença de PEG4000, apresentando todas as características presentes no espectro puro deste PEG. Contudo, o pico mais intenso verifica-se aos 4048m/z.

Na Figura 22, o espectro do ensaio ACY119 indica que o PEG utilizado foi o PEG3350, verificando-se, como no caso do ensaio ACY115, que o espectro é igual, relativamente ao do composto puro, excetuando o pico mais intenso, que neste caso é 3387m/z.

Contudo, ao analisar o espectro do lote comercial 8092267 (Figura 23), verifica-se que a intensidade do conjunto de picos se situa entre 1050m/z-2050m/z, apresenta conformação semelhante a uma distribuição normal e a diferença de massa molecular entre estes é constante em 44m/z, sendo o pico mais intenso desta distribuição em 1538m/z. Todos os dados adquiridos neste espectro indicam que o PEG presente tem uma massa molecular média de 1500.

No anexo C encontram-se as ampliações dos espectros presentes nesta secção.

Através dos resultados adquiridos pela espectrometria de massa verifica-se que, qualitativamente, a pomada de referência, em termos de base PEG, é composta por PEG300 e PEG1500. Este resultado invalida a metodologia utilizada anteriormente no desenvolvimento desta pomada por parte da Medinfar, que indicava uma base PEG composta por PEG400 e PEG3350.

Em relação à deteção de propilenoglicol, não foi possível confirmar a presença utilizando a espectrometria de massa porque o equipamento utilizado só deteta a partir de 45m/z. Como os três picos mais intensos são inferiores a este valor, torna-se necessário recorrer a outra metodologia.

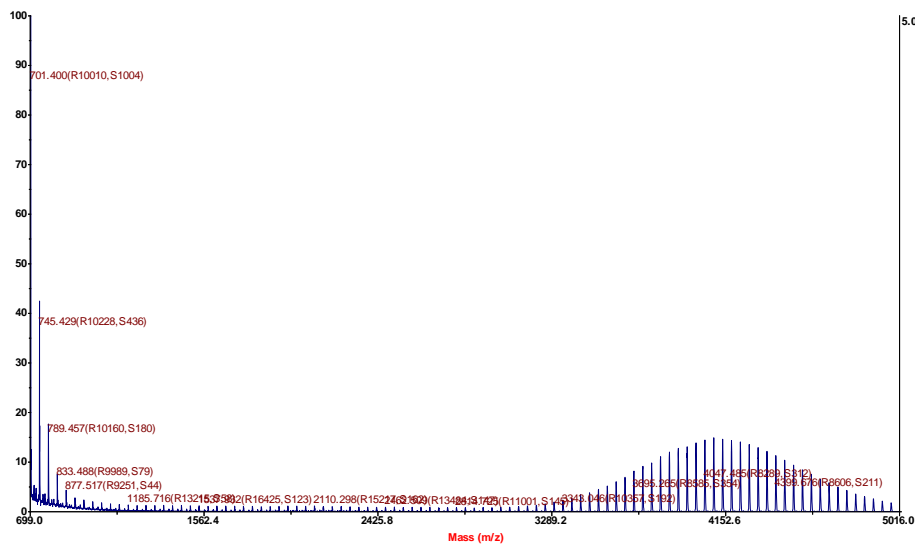


Figura 21 - Espectro de massa do ensaio ACY115, por MALDI, para a janela de 700m/z - 5000m/z

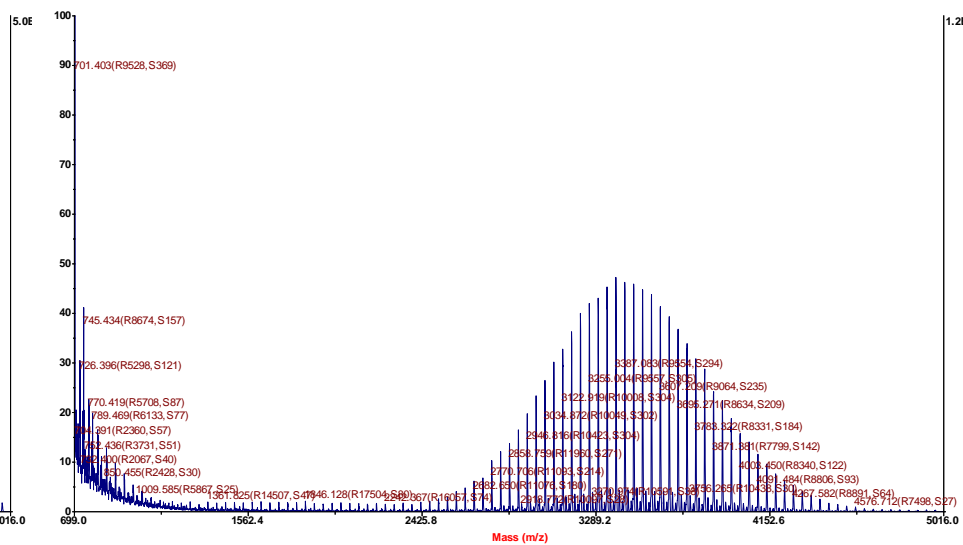


Figura 22 - Espectro de massa do ensaio ACY119, por MALDI, para a janela de 700m/z - 5000m/z

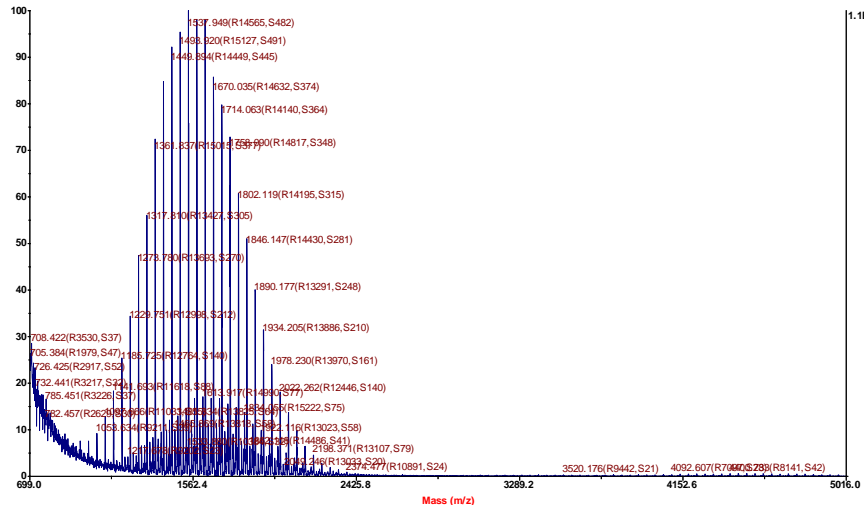


Figura 23 - Espectro de massa do lote 8092267, por MALDI, para a janela de 700m/z - 5000m/z

4.2 Cromatografia gasosa

Não sendo possível confirmar a presença de propilenoglicol através de espectrometria de massa, recorreu-se à cromatografia gasosa. Tratando-se de uma análise qualitativa, só foi considerada a presença de propilenoglicol em amostras com valores superiores a 1 parte por milhão (p.p.m), devido a este valor ser o limite de deteção do NIR. A quantidade de propilenoglicol foi extrapolada através da comparação das áreas das amostras com um padrão com concentração de 600 partes por bilhão (p.p.b).

Na Figura 24 encontra-se o cromatograma do ensaio ACY117. Verifica-se uma alteração do tempo de retenção provocada em função da banda do metanol, que foi o solvente utilizado. A quantidade estimada de propilenoglicol foi de 1500p.p.m, não diferindo muito da quantidade de 1220p.p.m utilizada na preparação do ensaio. A Figura 25 refere-se ao cromatograma do ensaio ACY119. Verifica-se, igualmente, uma alteração do tempo de retenção provocada em função da bossa do metanol. Apesar de não ter sido adicionado propilenoglicol, a análise por GC deste ensaio estima uma quantidade de propilenoglicol de 800p.p.b. Este valor poderá dever-se à contaminação de alguma das matérias-primas.

Relativamente aos lotes de referência, verifica-se que no lote 8072471 (Figura 26) foi detetado propilenoglicol. Contudo, não foi possível quantificar o propilenoglicol porque a área do pico da amostra é inferior ao limite de quantificação (600p.p.b), podendo apenas afirmar-se que a quantidade de propilenoglicol é inferior a 600p.p.b. Este resultado pode dever-se à degradação de alguma matéria-prima, devido à pomada já se encontrar fora do prazo de validade. No lote 8094939 (Figura 27) considerou-se que este não apresenta propilenoglicol, ainda que no cromatograma se verifique aos 5.75min um pico cuja razão massa-carga é de 45m/z. Contudo, a biblioteca de espectros do equipamento não identifica o pico, apesar deste apresentar muita similaridade com o espectro de massa do propilenoglicol.

No anexo D encontram-se as ampliações dos cromatogramas presentes nesta secção.

Com os resultados obtidos na análise qualitativa, concluiu-se que a pomada de referência, a nível de excipientes, é composta apenas por uma base PEG formada por PEG300 e PEG1500, não existindo propilenoglicol na sua constituição. Contudo não se pode descartar a possibilidade de existirem outros compostos presentes nos lotes comerciais. Com o conhecimento dos dados adquiridos até a este ponto foi possível avançar para a análise quantitativa.

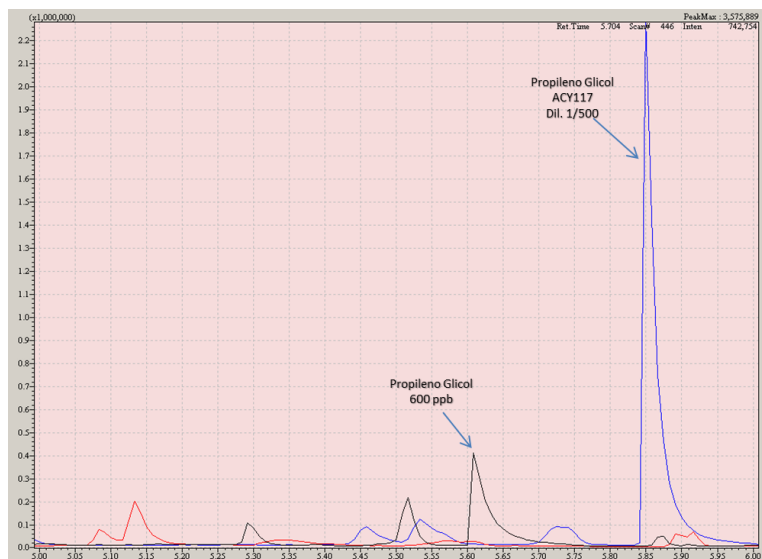


Figura 24 - Cromatograma do ensaio ACY117 (PEG400+PEG3350+Propileno glicol)

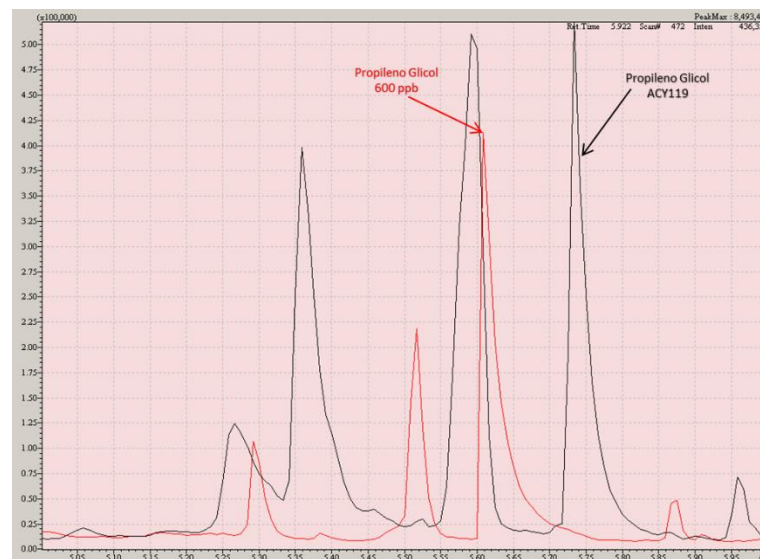


Figura 25 - Cromatograma do ensaio ACY119 (PEG400+PEG3350)

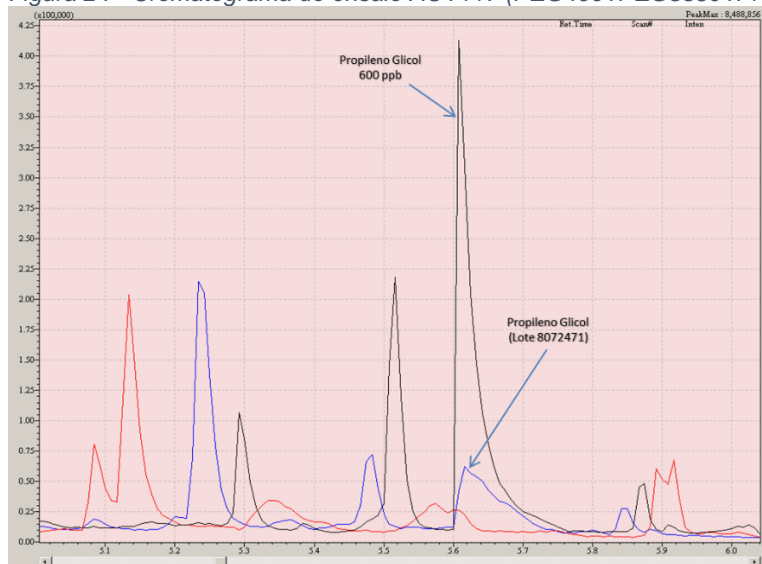


Figura 26 - Cromatograma do lote 8072471

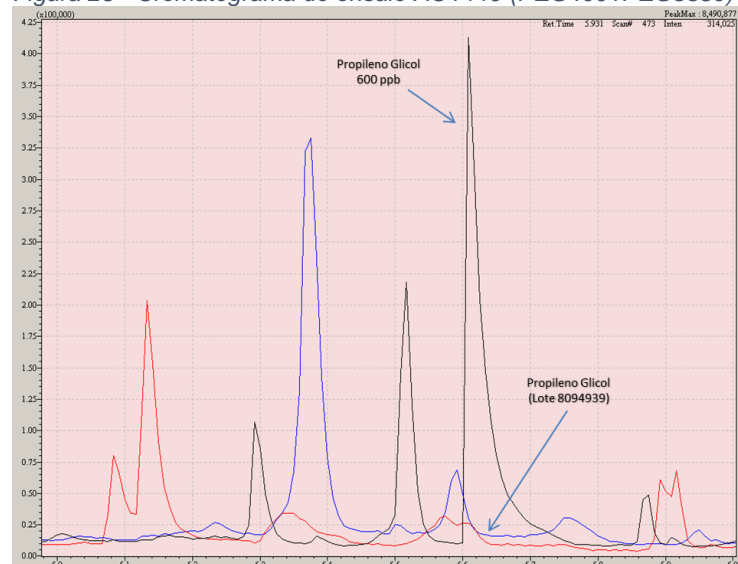


Figura 27 - Cromatograma do lote 8094939

4.3 Delineamento experimental para análise quantitativa

A quantidade dos constituintes que compõem os ensaios para análise quantitativa foi planeada com recurso a um DoE (Tabela 7), variando os constituintes presentes na formulação e mantendo constantes o procedimento e parâmetros de fabrico, tais como, temperatura, velocidade de agitação e tempos de cada fase. O aciclovir teve uma variação entre 4,75%(m/m) e 5,25%(m/m), sendo o valor central de 5%(m/m). Em relação aos PEGs, que compõem os restantes 95%(m/m) da pomada, a quantidade de PEG1500 foi centralizada em 50%(m/m), tendo variado em $\pm 10\%$, tendo-se escolhido este valor devido à existência de uma base PEG comercializada com esta percentagem(59). O restante completado com o PEG300.

O DoE construído foi um fatorial completo de 2 níveis, composto por 7 experiências, sendo 3 delas centradas na face (réplicas do ponto central), não tendo sido feita nenhuma réplica do delineamento. A ordem para a realização das experiências foi aleatória, evitando assim erros sistemáticos e minimizar possíveis diferenças que possam existir durante a preparação.

Tabela 7 - Ensaios para análise quantitativa planeadas por delineamento experimental (Anexo A)

Experiência número	Nome da experiência	Ordem de execução	PEG 300 [%]	PEG 1500 [%]	Aciclovir micronizado [%]
1	ACY123	3	55,25	40,00	4,75
2	ACY125	5	35,25	60,00	4,75
3	ACY121	1	54,75	40,00	5,25
4	ACY127	7	34,75	60,00	5,25
5	ACY122	2	45,00	50,00	5,00
6	ACY124	4	45,00	50,00	5,00
7	ACY126	6	45,00	50,00	5,00

4.4 Confirmação qualitativa

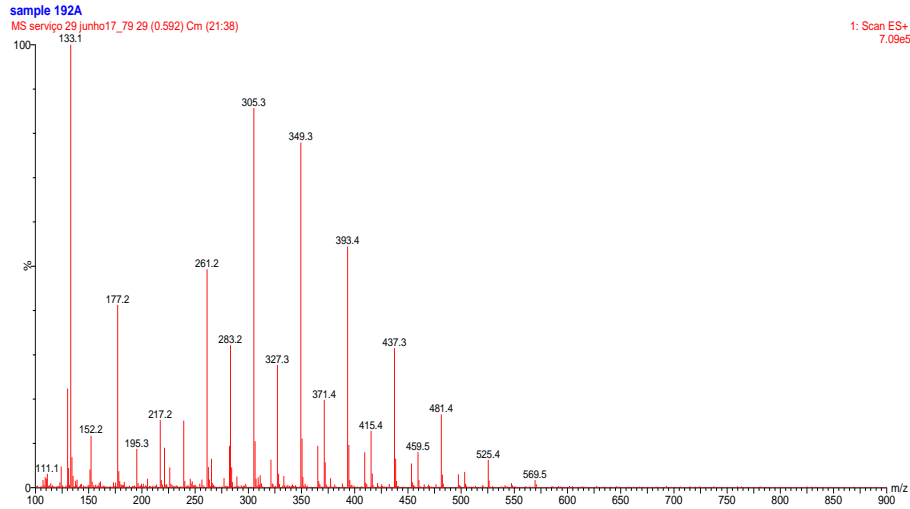
De modo a confirmar os componentes utilizados na preparação dos ensaios do DoE, realizou-se novamente uma análise qualitativa recorrendo a espectrometria de massa. Foi escolhido aleatoriamente um ensaio do DoE, neste caso o ensaio ACY124.

Verifica-se nos espectros ESI referentes ao ensaio ACY124 e ao lote 8094939, que a intensidade do conjunto de picos situados entre 100m/z-500m/z apresentam conformação semelhante a uma distribuição normal e a diferença de massa molecular entre estes é constante em 44m/z, sendo o pico mais elevado desta distribuição em 305m/z, confirmando a presença de um PEG com massa molecular média de 300.

Ao verificar os espectros MALDI, confirma-se a presença de um PEG com massa molecular média de 1500 no ensaio ACY124, pois a intensidade do conjunto de picos, situados entre 1050m/z-2050m/z, com o pico mais intenso desta distribuição em 1538m/z. Contudo, ao analisar o espectro referente ao lote 8094939 verifica-se que apesar da distribuição dos picos ser igual ao ensaio ACY124, o pico mais intenso desta distribuição ocorre em 1362m/z, indicando assim que o PEG presente tem uma massa molecular média de 1300.

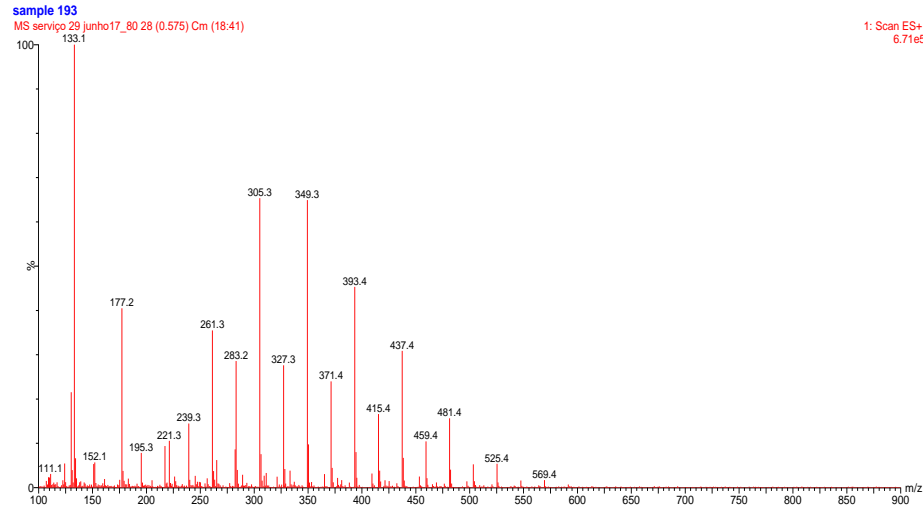
No anexo E encontram-se as ampliações dos espectros presentes nesta secção.

Através destes resultados confirma-se que, qualitativamente, o ensaio ACY124, em termos de base PEG, é composto por PEG300 e PEG1500. Contudo, em relação ao lote 8094939 verifica-se que, em termos de base PEG, é composto por PEG300 e PEG1300 contrariamente aos resultados obtidos na análise do lote 8092267. Esta diferença pode dever-se ao facto do lote 8094939 encontrar-se com validade expirada..



1: Scan ES+
7.09e5

Figura 28 - Espectro de massa do ensaio ACY124, por ESI, para a janela de 100m/z - 900m/z



1: Scan ES+
6.71e5

Figura 29 - Espectro de massa do lote 8094939, por ESI, para a janela de 100m/z - 900m/z

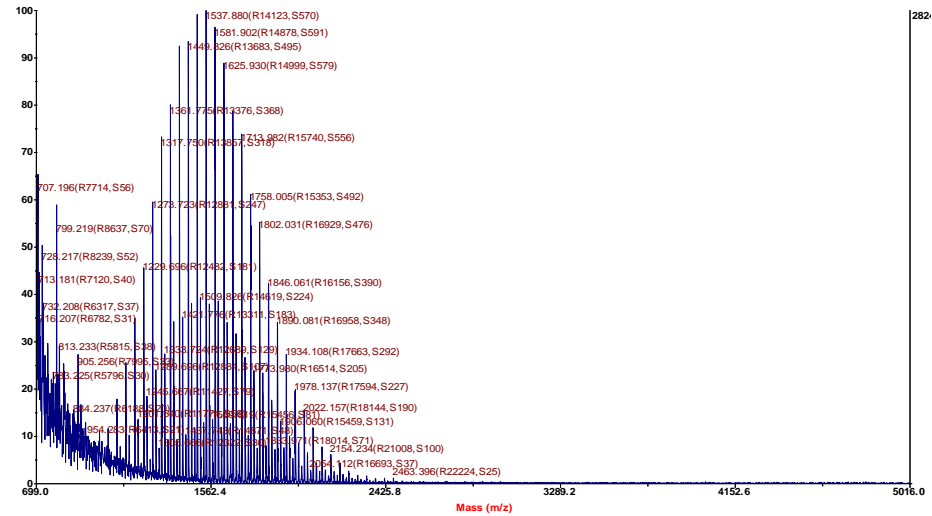


Figura 30 - Espectro de massa do ensaio ACY124, por MALDI, para a janela de 700m/z - 5000m/z

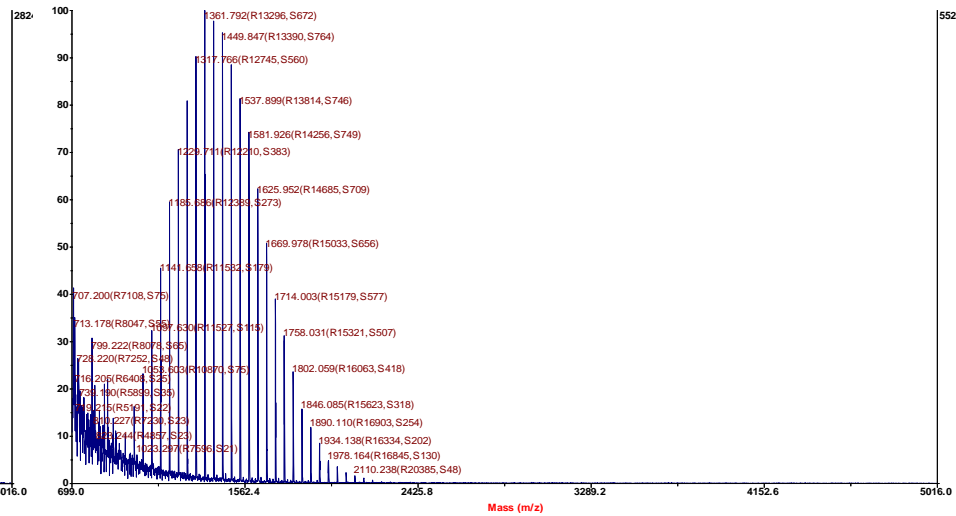


Figura 31 - Espectro de massa do lote 8094939, por MALDI, para a janela de 700m/z - 5000m/z

4.5 Análise quantitativa

Após a preparação das amostras do DoE, estas foram analisadas por espectrofotometria NIR. A aquisição dos espectros de absorvância foi feita por refletância difusa para todos os componentes, utilizando politetrafluoretileno (PTFE) como branco. Com compostos transparentes e translúcidos não é possível obter espectros por refletância difusa porque a radiação atravessa toda a amostra, impossibilitando que esta seja devolvida ao equipamento. Como o PEG300 é um líquido transparente e para evitar o aumento de variabilidade ao comparar espectros com modos de leitura diferentes, experimentou-se obter os espectros deste PEG através de refletância difusa, colocando um disco de PTFE sobre a amostra, de modo a permitir que a radiação seja devolvida ao equipamento. Foram produzidos dois discos, sendo que o disco da Figura 32A se destinou a compostos semi-sólidos e o da Figura 32B a compostos líquidos. Verificou-se que a utilização dos discos permitiu obter espectros com melhor razão sinal-ruído, comparativamente com os espectros obtidos por transmitância, pelo que se utilizou os discos para a aquisição dos espectros.

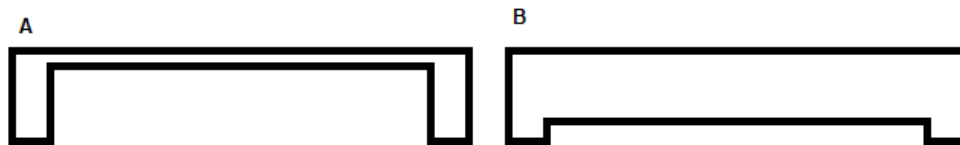


Figura 32 - Representação dos discos de PTFE utilizados

A Figura 33 apresenta o espectro NIR dos compostos puros verificando-se que o PEG300 e o PEG1500 têm os espectros muito semelhantes, variando essencialmente na intensidade dos picos. Verifica-se, igualmente, que o aciclovir tem absorção fraca na zona espectral referente ao NIR.

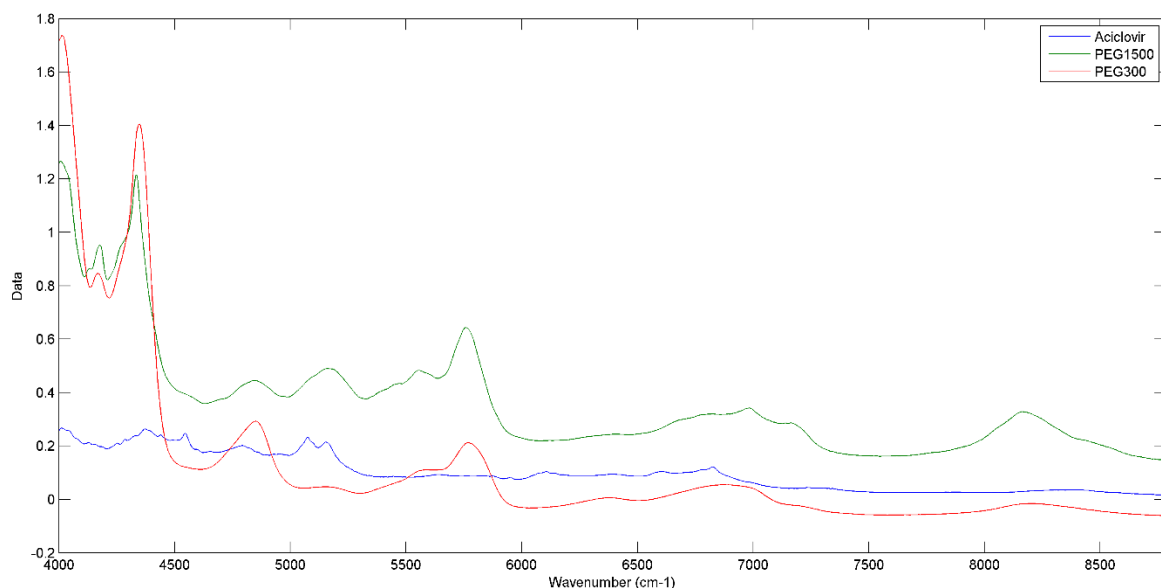


Figura 33 - Espectros NIR dos constituintes puros presentes na pomada obtidos por refletância difusa

Ao comparar os espectros dos constituintes puros, das amostras do DoE e do lote 8092267 (Figura 34) observa-se que em alguns espectros das amostras do DoE e do lote 8092267 houve deslocamento

dos picos em algumas zonas do espectro. Este desvio ocorre para a esquerda em cerca de 50cm^{-1} nos espectros dos lotes de referência e de alguns ensaios comparativamente aos picos do espectro de aciclovir puro.

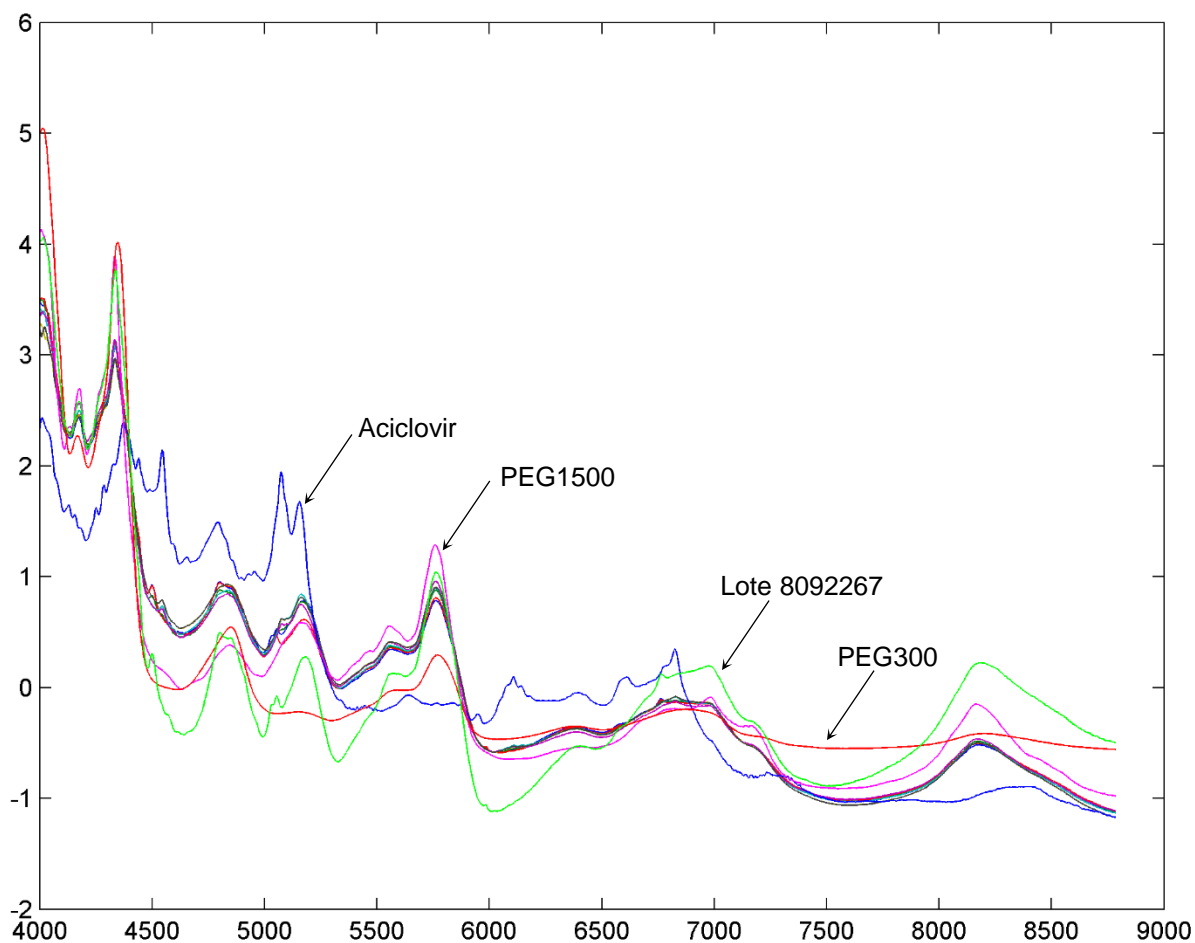


Figura 34 - Espectros NIR dos constituintes puros presentes na pomada e dos ensaios do delineamento experimental obtidos por refletância difusa

Os picos presentes na primeira zona do espectro (Figura 35) correspondem principalmente a interações de ligações N-H, C-N, C=O, sendo também uma zona de absorção da água(43,60). Os picos presentes na segunda zona do espectro (Figura 36) correspondem principalmente a ligações N-H presentes em amidas e ligações O-H presentes em polímeros, como os PEGs(43,60). Os picos presentes na terceira zona do espectro (Figura 37) correspondem principalmente a interações de ligações N-H presentes em amins primárias de compostos aromáticos(43,60). Os picos presentes na quarta zona do espectro (Figura 38) correspondem principalmente a interações de ligações C-H relacionadas com grupos carbonilo(43,60). Os picos presentes na quinta zona do espectro (Figura 39) correspondem principalmente a interações de ligações N-H em amins secundárias(43,60). Os picos presentes na sexta zona do espectro correspondem (Figura 40) principalmente a ligações N-H(43,60).

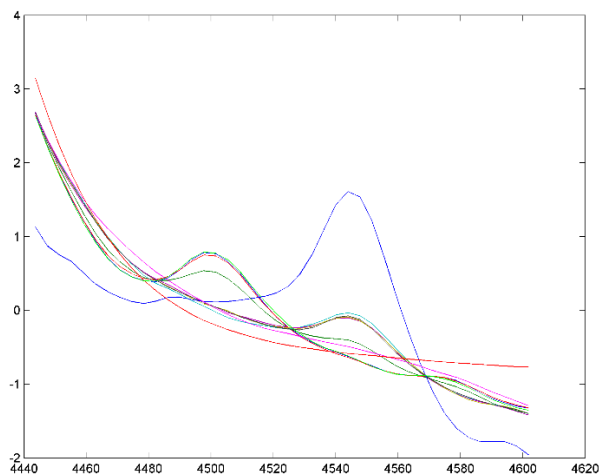


Figura 35 - Primeira zona espectral de deslocamento de picos

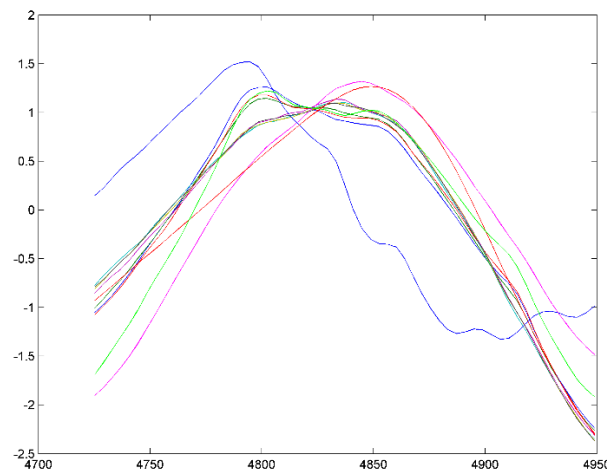


Figura 36 - Segunda zona espectral de deslocamento de picos

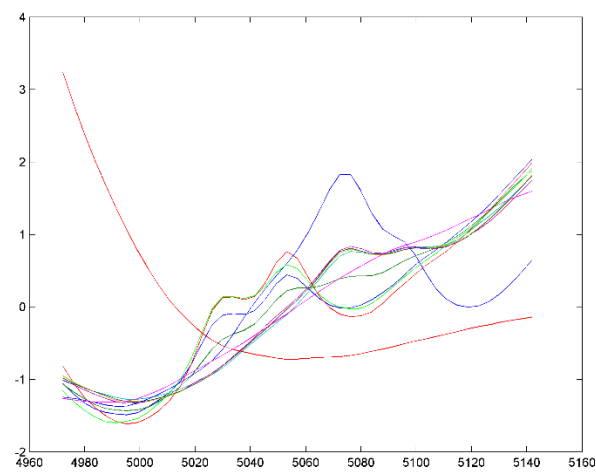


Figura 37 - Terceira zona espectral de deslocamento de picos

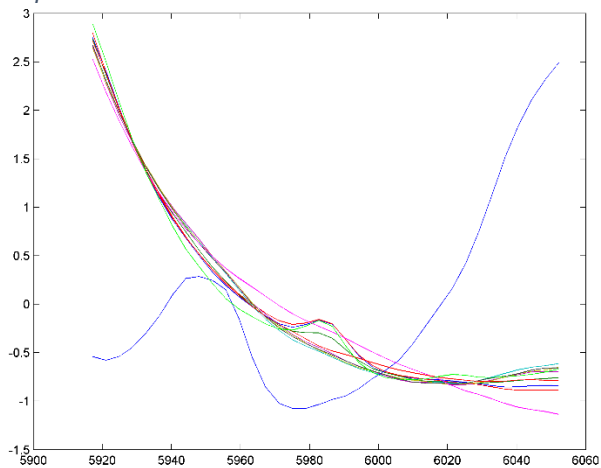


Figura 38 - Quarta zona espectral de deslocamento de picos

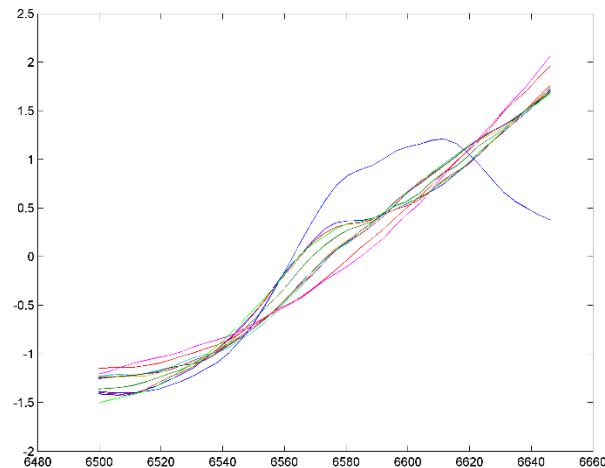


Figura 39 - Quina zona espectral de deslocamento de picos

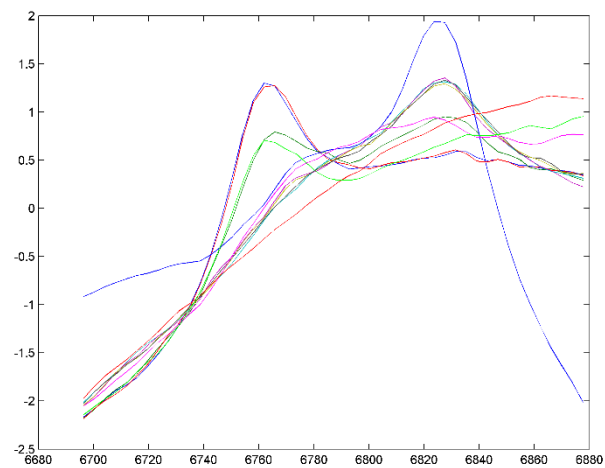


Figura 40 - Sexta zona espectral de deslocamento de picos

Estando estas deslocações associadas, maioritariamente, ao espectro do aciclovir e ocorrendo em zonas de picos de absorção de água, decidiu-se avaliar a presença de água no aciclovir, de forma a verificar se em algum momento do processo através da interação com os PEGs ou devido às condições de acondicionamento, o aciclovir ficou hidratado(61–63). Para isso colocou-se um pouco de aciclovir numa estufa a 50°C, adquirindo-se o espectro ao fim de 17h, sendo novamente colocado na estufa, desta vez a 70°C, adquirindo-se o espectro após 4h. Na Figura 41 estão apresentados estes espectros e verificando-se uma diferença mínima, ocorrendo apenas a nível de intensidade, confirmando que a presença de água não é a causa da deslocação dos picos.

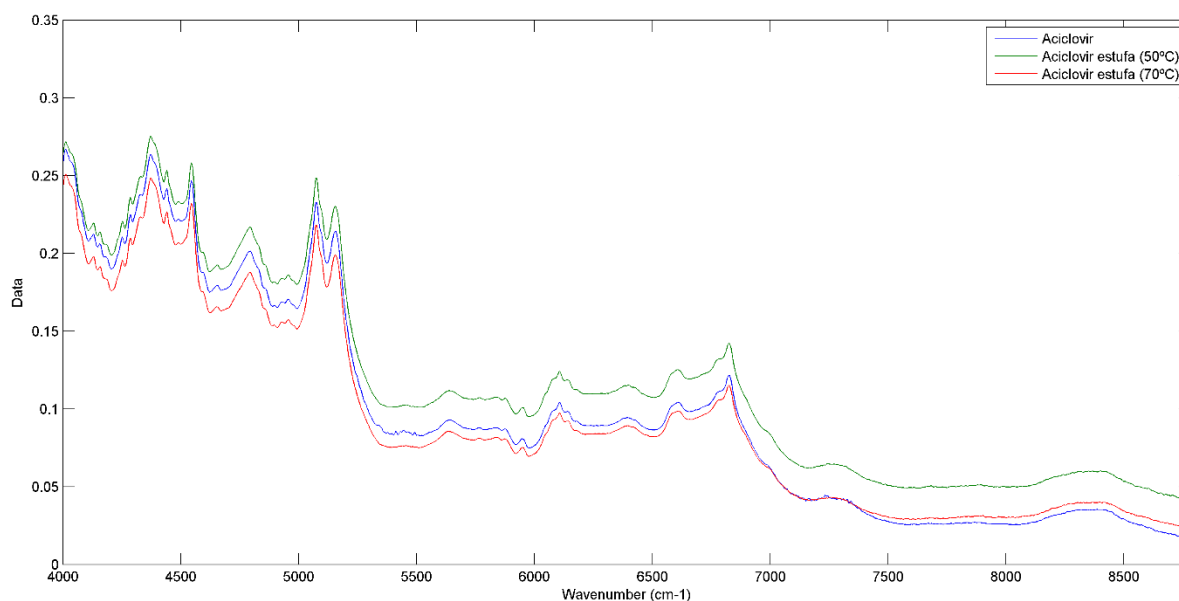


Figura 41 - Espectros NIR do aciclovir, do aciclovir em estufa a 50°C e do aciclovir em estufa a 70°C, obtidos por refletância difusa

Com o intuito de testar a hipótese de as deslocações dos picos se deverem a interações entre os PEGs, prepararam-se bases PEG sem aciclovir e replicou-se um dos ensaios que apresentava as deslocações dos picos (Tabela 8), como acontecia igualmente nas pomadas de referência. As bases PEG preparadas tinham percentagem semelhante às bases PEG das amostras cujo espectro apresentava deslocação de picos.

Tabela 8 - Composição dos ensaios ACY128 a ACY132 (Anexo A)

Ensaio	PEG 300 [%]	PEG 1500 [%]	Aciclovir micronizado [%]
ACY128	54,75	40,00	5,25
ACY129	57,89	42,11	0,00
ACY130	47,37	52,63	0,00
ACY131	52,63	47,37	0,00
ACY132	50,00	50,00	0,00

Na Figura 42 verifica-se que a deslocação dos picos não é devida a interações entre os PEGs, concluindo-se que o aciclovir é o responsável pela deslocação dos picos. Ao analisar atentamente o

procedimento utilizado na preparação das amostras, constatou-se que a causa poderá estar na quantidade de PEG300 utilizada na incorporação, sendo que esta deslocação só aparece caso o aciclovir fique bem incorporado na base PEG, servindo como um indicador da uniformidade do produto acabado.

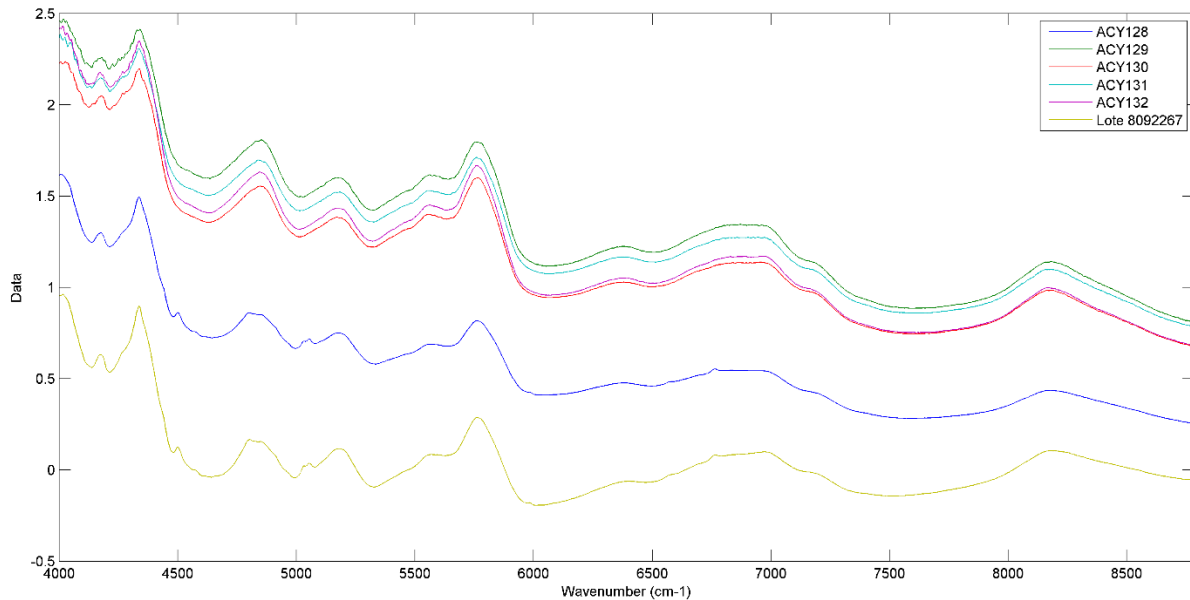


Figura 42 - Espectros NIR dos ensaios ACY128 a ACY132 e do lote 8092267 obtidos por refletância difusa

Para ultrapassar o problema da deslocação dos picos, eliminou-se a zona espectral onde estes se encontravam (Figura 43).

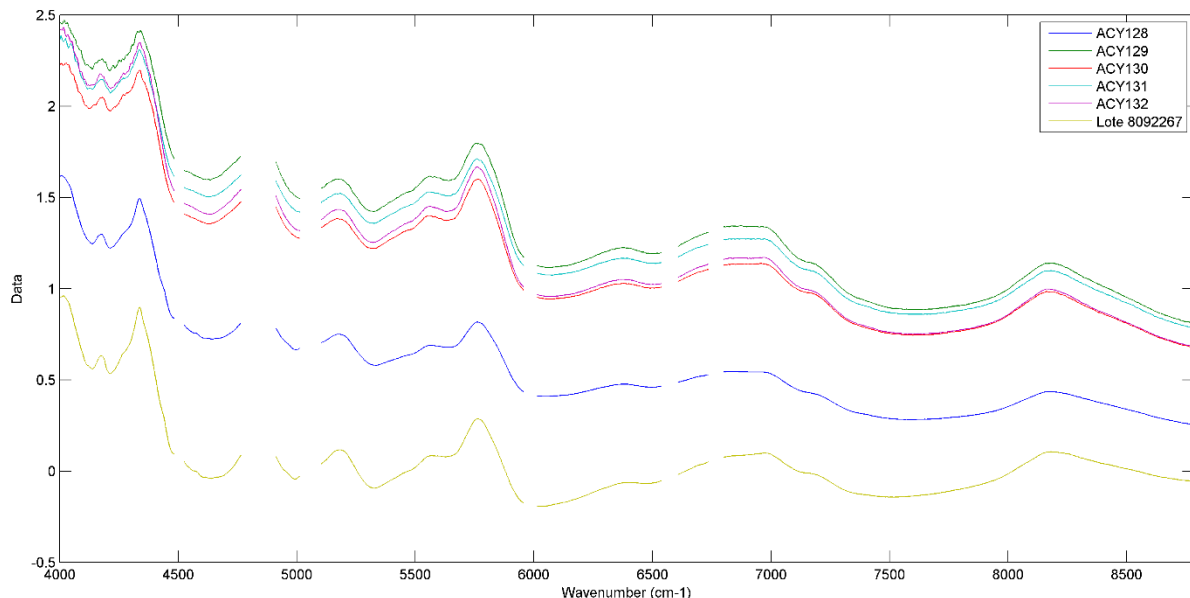


Figura 43 - Representação gráfica dos espectros utilizados, com a exclusão das bandas correspondentes ao aciclovir nas pomadas

A primeira análise consiste em relacionar os ensaios compostos apenas com base PEG com o ensaio ACY128 e com as pomadas de referência, aplicando-se previamente como pré-processamento

o método Savitzky-Golay com 1ª derivada, 15 pontos de tamanho de filtro e polinómio de 2ª ordem (Figura 44), de modo a aumentar as diferenças existentes entre os espectros.

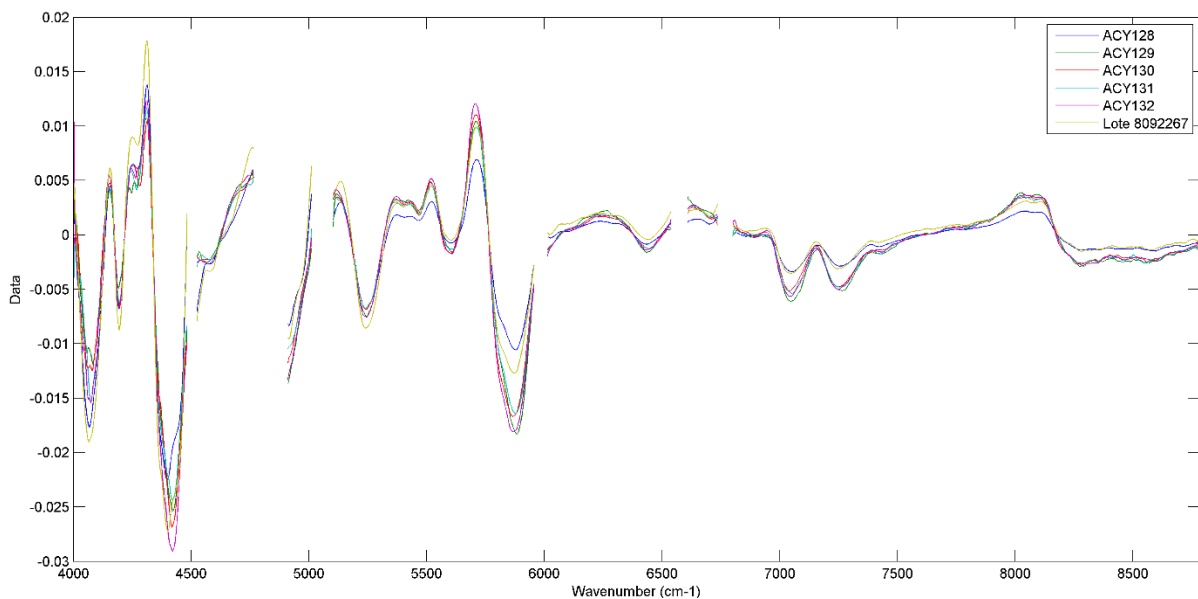


Figura 44 - Representação gráfica dos espectros utilizados após a aplicação do pré-processamento

A análise quimiométrica realizada trata-se de uma análise de grupos aglomerativa utilizando o método de Ward.

Através do dendrograma apresentado na Figura 45, verifica-se que as pomadas de referência e o ensaio ACY128 são mais semelhantes entre si relativamente aos outros ensaios que contêm apenas base PEG. Isto deve-se ao facto dos outros ensaios não conterem o aciclovir, indicando que o principal fator de diferença é a nível qualitativo, ou seja, a presença ou ausência de aciclovir. Contudo o lote L8092267 é menos semelhante comparativamente com os outros lotes de referência. Isto pode dever-se ao facto de o lote L8092267 conter PEG1500 e os outros lotes de referência conterem PEG1300. Devido à semelhança entre o lote L8092267 e o ensaio ACY128 conclui-se que a percentagem de PEG300 e PEG1500 é igual, sendo também confirmado pela semelhança existente entre estes e o ensaio ACY129 (base PEG do ensaio ACY128).

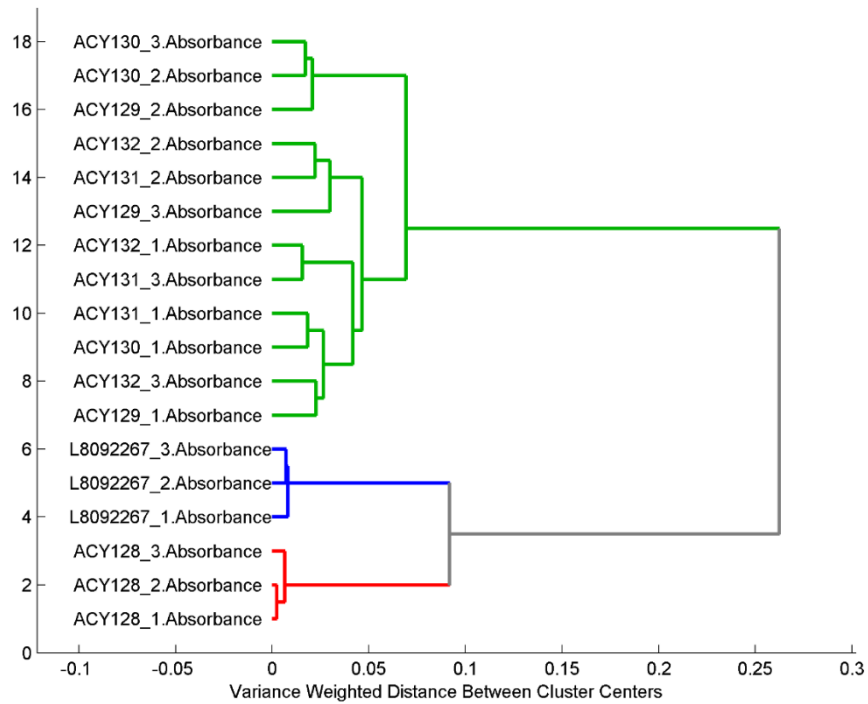


Figura 45 - Dendrograma com os ensaios ACY128 a ACY 132 e pomadas de referência

No dendrograma da Figura 46 verifica-se que a pomada de referência e o ensaio ACY128 são mais semelhantes entre si do que os outros ensaios compostos apenas com base PEG. Isto deve-se ao facto dos outros ensaios não conterem o aciclovir, indicando que o método quimiométrico utilizado é sensível à ausência de aciclovir, apesar da eliminação das zonas espectrais com os picos de deslocados do aciclovir. Verifica-se, igualmente, que o lote L8092267 e o ensaio ACY128 estão presentes no mesmo grupo, concluindo-se assim que a percentagem de PEG300 e PEG1500 é aproximada, ou seja, 55% e 40%, respetivamente. Este resultado também é confirmado pela semelhança existente entre estes e o ensaio ACY129 (branco do ACY128).

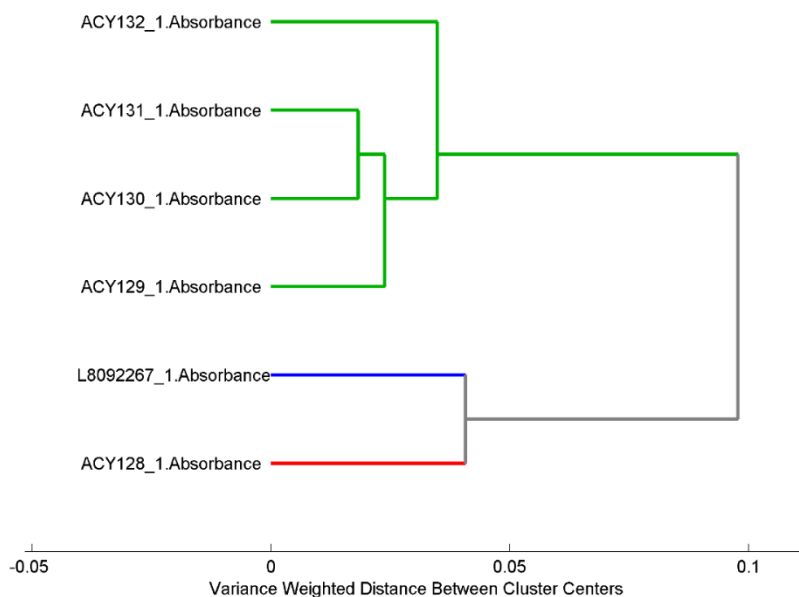


Figura 46 - Dendrograma com os ensaios ACY128 a ACY 132 e lote 8092267

A segunda análise consiste em relacionar os ensaios do DoE com as pomadas de referência. Para ultrapassar o problema da deslocação dos picos, eliminou-se a zona espectral onde estes se encontravam (Figura 47).

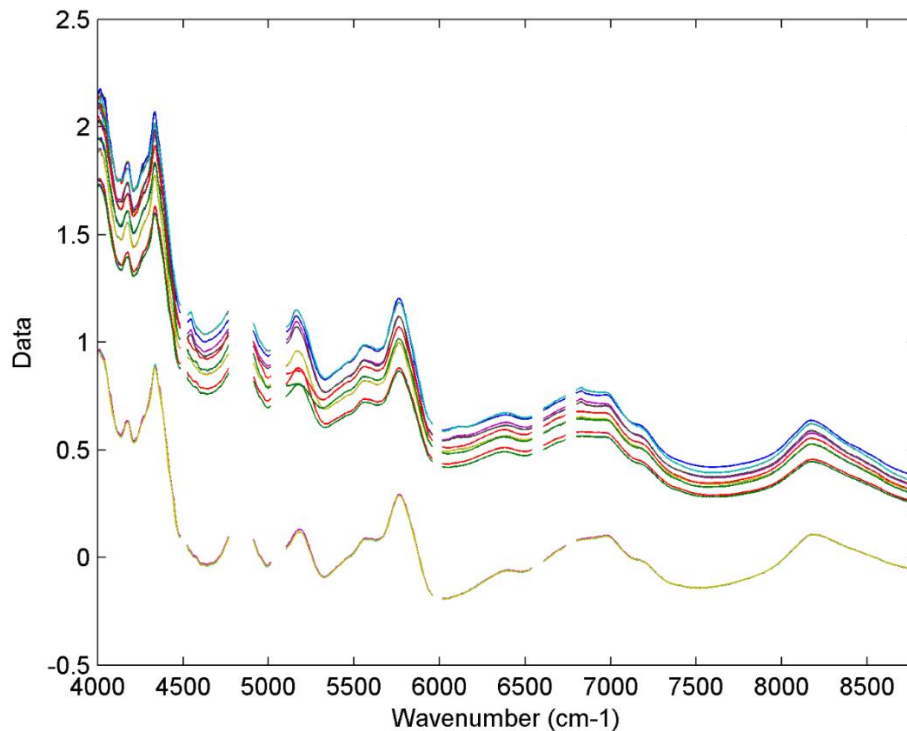


Figura 47 - Representação gráfica dos espectros utilizados, com a exclusão das bandas correspondentes ao aciclovir nas pomadas

Como pré-processamento foi aplicado o método Savitzky-Golay com 1ª derivada, 15 pontos de tamanho de filtro e polinómio de 2ª ordem (Figura 48), de modo a aumentar as diferenças existentes entre os espectros.

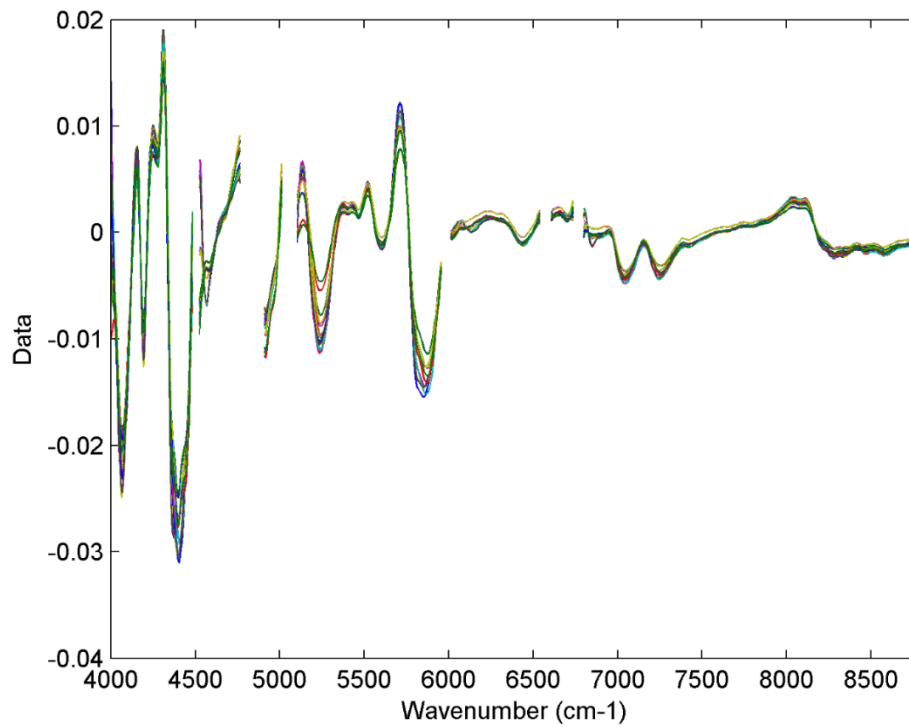


Figura 48 - Representação gráfica dos espectros utilizados após a aplicação do pré-processamento

Através do dendrograma da Figura 49 verifica-se que o lote L8092267 e o ensaio ACY122 são mais semelhantes entre si do que com os outros ensaios. Devido à semelhança entre o lote L8092267 e o ensaio ACY122 conclui-se que a percentagem de PEG300 e PEG1500 é igual, ou seja 45% e 50%, respetivamente.

Dendrogram of Data with Preprocessing: 1st Derivative (order: 2, window: 15 pt, incl only, tails: polyinterp)

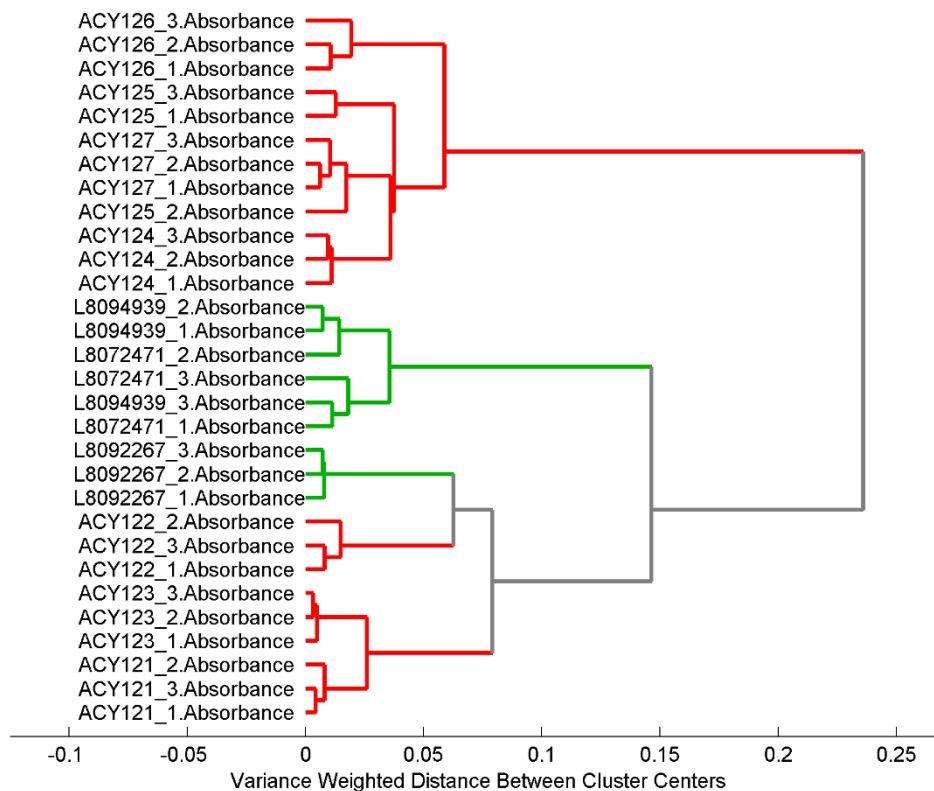


Figura 49 - Dendrograma com ensaios do DoE e pomadas de referência

Concluindo, através dos resultados obtidos verificou-se que a pomada mais semelhante com lotes da pomada de referência foi o ensaio ACY122, pelo que se considera que a formulação final seja a seguinte (Tabela 9):

Tabela 9 - Formulação final

Componente	Aciclovir	PEG300	PEG1500
%(m/m)	5	45±5%	50±5%

Contudo, devido a toda a variabilidade entre lotes comerciais (nem sempre é utilizada a mesma base PEG) e atribuindo uma margem de erro de ±5% na previsão da percentagem dos PEGs, não se pode excluir a possibilidade de ser uma base PEG existente comercialmente, visto que a base LANOGEN® 1500 (composta por PEG300 e PEG1500 na proporção de 1:1)(59) é semelhante aos resultados obtidos, traduzindo-se na seguinte formulação (Tabela 10):

Tabela 10 - Formulação final com base PEG comercial

Componente	Aciclovir	PEG300	PEG1500
%(m/m)	5	47,5	47,5

5. Conclusão

Concluindo, os objetivos inicialmente definidos nesta dissertação para o desenvolvimento farmacêutico de uma pomada genérica de aciclovir por engenharia reversa foram cumpridos.

Demonstrou-se que, através de MS, é possível identificar os compostos presentes na formulação do produto de referência, tendo sido identificado o PEG300 e o PEG1500. Verificou-se, com a análise por MS, que os lotes do produto de referência têm variações no PEG de elevado peso molecular, detetando-se amostras que contém PEG1300 e outras que contém PEG1500, podendo esta diferença dever-se a degradações. Em relação ao propilenoglicol, este não foi detetado por MS devido ao equipamento detetar, no mínimo, 45m/z, sendo que a utilização de GC revelou-se uma boa alternativa para este caso em concreto.

O método de fabrico utilizado foi otimizado com base no procedimento já existente, identificando-se os parâmetros críticos do processo, apesar de durante o desenvolvimento das amostras ter-se verificado que existe a possibilidade de se utilizar outro procedimento para produzir esta pomada.

Em termos da análise quantitativa, a espectrofotometria NIR por refletância difusa demonstrou ser bastante sensível, conseguindo identificar diferenças ao nível da microestrutura (ausência de incorporação total do aciclovir ou ausência deste) entre as amostras e a pomada de referência. Estas diferenças apresentaram-se sob a forma de deslocamento para a esquerda de determinados picos (contribuições do aciclovir) em cerca de 50cm^{-1} em relação ao espectro de aciclovir, influenciando os resultados da análise quimiométrica, tendo sido excluídas as zonas onde este fenómeno ocorria.

A análise quimiométrica através da análise de grupos hierárquica aglomerativa utilizando o método de Ward revelou-se eficaz, pois consegui ter sensibilidade suficiente para classificar as amostras e os produtos de referência, colocando a amostra ACY122 e o lote 8092267 no mesmo grupo, indicando que estas duas formulações têm maior semelhança entre si do que com todas as outras formulações em análise.

Com todos os dados adquiridos durante o desenvolvimento foi possível apresentar uma formulação final constituída por 5%(m/m) de aciclovir, $45\pm 5\%$ (m/m) de PEG300 e $50\pm 5\%$ (m/m) de PEG1500.

6. Perspetivas futuras

Este trabalho focou-se essencialmente no desenvolvimento da formulação através de engenharia reversa, sendo de seguida apresentadas ideias para possíveis trabalhos futuros.

- Desenvolver a pomada de modo a obter-se equivalência Q3.
- Averiguar se a presença de PEG1300 se deve à degradação do produto.
- Desenvolver outros tipos de formulações tópicas de aciclovir utilizando engenharia reversa.
- Utilizar outras ferramentas quimiométricas para a análise quantitativa.
- Desenvolver o método de fabrico através da estratégia de *Quality-by-Design*.
- Comparar métodos de fabrico diferentes e avaliar o impacto na microestrutura da formulação.
- Aplicar a metodologia descrita na produção de outros produtos biossimilares.
- Desenvolver uma metodologia que permita relacionar a aquisição de espectros por refletância difusa com a aquisição de espectros por transmitância em espectrometria NIR.
- Desenvolver um método para aquisição de espectros de compostos líquidos e semi-sólidos por refletância difusa.

Referências bibliográficas

1. Chang R-K, Raw A, Lionberger R, Yu L. Generic development of topical dermatologic products: formulation development, process development, and testing of topical dermatologic products. *AAPS J* [Internet]. 2013 Jan 10;15(1):41–52. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3535108/>
2. Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Fundação C. Fundação Calouste Gulbenkian, editor. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2001.
3. Mahalingam R, Li X, Jasti BR. Semisolid Dosages: Ointments, Creams, and Gels. In: *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes* [Internet]. Hoboken, NJ, EUA: John Wiley & Sons, Inc.; 2007. p. 267–312. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470259818.ch9/summary>
4. Buhse L, Kolinski R, Westenberger B, Wokovich A, Spencer J, Chen CW, et al. Topical drug classification. *Int J Pharm* [Internet]. 2005 [cited 2017 Sep 16];295(1–2):101–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851730500102X>
5. Osborne DW. Review of Changes in Topical Drug Product Classification [Internet]. [cited 2017 Sep 16]. Available from: <http://www.pharmtech.com/review-changes-topical-drug-product-classification>
6. Shah VP, Yacobi A, Rădulescu FŞ, Miron DS, Lane ME. A science based approach to topical drug classification system (TCS). *Int J Pharm* [Internet]. 2015;491(1–2):21–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517315005220?via%3Dihub>
7. Davit BM. Regulatory Approaches for Generic Drugs: BE of Topical Drug Products. In: *Evaluation of New and Generic Topical Drug Products* [Internet]. 2013. p. 21–4. Available from: <http://pqri.org/wp-content/uploads/2015/08/pdf/Davit.pdf>
8. Food and Drug Administration. Draft Guidance on Acyclovir [Internet]. 2012. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm296733.pdf>
9. Food and Drug Administration. FDA CDER to Valeant Pharmaceuticals Intl Inc Petition Denial [Internet]. 2012. Available from: <https://www.regulations.gov/document?D=FDA-2012-P-0779-0004>
10. Chang R-K, Raw A, Lionberger R, Yu L. Generic development of topical dermatologic products, Part II: quality by design for topical semisolid products. *AAPS J* [Internet]. 2013 Jul [cited 2017 Sep 1];15(3):674–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23572241>
11. Shah VP. Topical Drug Products Regulatory Requirements (USA). In: *To and Thru the Skin* [Internet]. Mumbai, India; 2009. Available from: http://www.ipapharma.org/pdf/speaker/1.02_Vinod_Shah_topical.pdf
12. Lionberger R. Quality by Design for Topical Dosage Forms [Internet]. Available from: https://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/slides/2005-4137S2_04_Lionberger.ppt
13. Lu M, Xing H, Chen X, Xian L, Jiang J, Yang T, et al. Advance in bioequivalence assessment

- of topical dermatological products. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2016;11(6):700–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2016.04.008>
14. Yacobi A, Shah VP, Bashaw ED, Benfeldt E, Davit B, Ganes D, et al. Current challenges in bioequivalence, quality, and novel assessment technologies for topical products. *Pharm Res* [Internet]. 2014;31(4):837–46. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1259-1>
 15. Bansal AK, Koradia V. The Role of Reverse Engineering in the Development of Generic Formulations [Internet]. Vol. 29. 2005 [cited 2017 Sep 1]. Available from: <http://www.pharmtech.com/role-reverse-engineering-development-generic-formulations?id=&pageID=1&sk=&date=>
 16. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Nonsterile Semisolid Dosage Forms [Internet]. 1997. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070930.pdf>
 17. Kitagawa S, Yutani R, Kodani R ichi, Teraoka R. Differences in the rheological properties and mixing compatibility with heparinoid cream of brand name and generic steroidal ointments: The effects of their surfactants. *Results Pharma Sci* [Internet]. 2016;6:7–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rinphs.2016.02.001>
 18. Food and Drug Administration, Glaxo Wellcome Inc. Zovirax® Ointment 5% [Internet]. 2001 [cited 2017 Sep 15]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2001/018604s018lbl.pdf
 19. Valeant Canada. Zovirax® Product monograph. Québec, Canadá; 2014.
 20. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=2022 [Internet]. [cited 2017 Sep 1]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2022>
 21. Brunton LL, Brunton LL, Chabner BA. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 12ª edição. AMGH Editra Ltda., editor. Mc Graw Hill; 2012.
 22. Spruance SL, Nett R, Marbury T, Wolff R, Johnson J. Acyclovir Cream for Treatment of Herpes Simplex Labialis : Results of Clinical Trials. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2002;46(7):2238–43. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC127288/>
 23. Allen Jr. L V. Basics of compounding for the treatment of warts. *Int J Pharm Compd* [Internet]. 2004 [cited 2017 Sep 1];8(2):126–9. Available from: <https://www.ijpc.com/Abstracts/Abstract.cfm?ABS=1721>
 24. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Polyethylene Glycol. In: *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6ª Edição. Pharmaceutical Press; 2009. p. 517–22.
 25. NF Monographs: Polyethylene Glycol [Internet]. [cited 2017 Sep 1]. Available from: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m66430.html
 26. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=174 [Internet]. [cited 2017 Sep 1]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/174>
 27. Sigma-Aldrich. Polyethylene glycol [Internet]. Sigma-Aldrich, Inc; Available from: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p4338pis.pdf
 28. Polyethylene glycol - National Library of Medicine HSDB Database [Internet]. 2014 [cited 2017

- Sep 1]. Available from: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+5159>
29. Hoffmann E De, Stroobant V. Mass Spectrometry - Principles and Applications [Internet]. Vol. 29, Mass spectrometry reviews. 2007. 945-61 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057935>
 30. IonSource LCC. Interpreting Electrospray Mass Spectra [Internet]. 2016 [cited 2017 Sep 1]. p. 17–8. Available from: <http://www.ionsource.com/tutorial/spectut/spec1.htm>
 31. Yan W, Ammon, Jr D, Gardella, Jr J, Maziarz, III E, Hawkrige A, Grobe, III G, et al. Quantitative mass spectrometry of technical polymers: a comparison of several ionization methods. *Eur J Mass Spectrom* [Internet]. 1998;4(1):467. Available from: https://www.researchgate.net/publication/228491942_Quantitative_mass_spectrometry_of_technical_polymers_A_comparison_of_several_ionization_methods
 32. Shimadzu Corporation. Principles of MALDI-TOF Mass Spectrometry [Internet]. [cited 2017 Sep 1]. Available from: <http://www.shimadzu.com/an/lifescience/maldi/princpl1.html>
 33. van Kampen JJA, Burgers PC, de Groot R, Luider TM. Qualitative and Quantitative Analysis of Pharmaceutical Compounds by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal Chem* [Internet]. 2006 Aug;78(15):5403–11. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac060436i>
 34. Wang P, Giese RW. Recommendations for quantitative analysis of small molecules by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* [Internet]. 2017;1486:35–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.040>
 35. Mass Spectrometry Interpretation [Internet]. Available from: <https://edisciplinas.usp.br/mod/resource/view.php?id=84059>
 36. Enjalbal C, Ribière P, Lamaty F, Yadav-Bhatnagar N, Martinez J, Aubagnac JL. MALDI-TOF MS analysis of soluble PEG based multi-step synthetic reaction mixtures with automated detection of reaction failure. *J Am Soc Mass Spectrom* [Internet]. 2005;16(5):670–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.01.020>
 37. CHROMacademy. Theory and Instrumentation of GC Sample Introduction [Internet]. Crawford Scientific. 2012. Available from: http://www.chromacademy.com/lms/sco10/Theory_and_Instrumentation_Of_GC_Introduction.pdf
 38. Yuwono M. Gas Chromatography System Instrumentation. *Encycl Chromatogr* [Internet]. 1990;1–5. Available from: <http://docplayer.net/50388102-Gas-chromatography-system-instrumentation.html>
 39. Miller CE. Chemometrics in Process Analytical Chemistry. In: Bakeev KA, editor. *Process Analytical Technology* [Internet]. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 2007. p. 226–328. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470988459.ch8>
 40. Rodrigues MAC. Desenvolvimento de um medicamento genérico com aplicação de desenho experimental na otimização da formulação. Instituto Superior Técnico; 2015.
 41. Rodrigues AA. Análise de um processo farmacêutico de mistura de pós com espectroscopia NIR e ferramentas quimiométricas. Instituto Superior Técnico; 2015.

42. Tan P-N, Steinbach M, Kumar V. Cluster Analysis: Basic Concepts and Algorithms. In: Introduction to Data Mining [Internet]. 2005 [cited 2017 Sep 5]. p. Chapter 8. Available from: <https://www-users.cs.umn.edu/~kumar/dmbook/ch8.pdf>
43. Burns DA, Ciurczak EW. Handbook of Near-Infrared Analysis. Third Edit. Florida, EUA: CRC Press; 2007.
44. Almeida FMN. Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) na Caracterização de Farinhas para Alimentação Pueril. Instituto Superior Técnico; 2009.
45. De Beer T, Burggraef A, Fonteyne M, Saerens L, Remon JP, Vervaet C. Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes. Int J Pharm [Internet]. 2011;417(1–2):32–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.012>
46. Popo M, Romero-Torres S, Conde C, Romañach RJ. Blend uniformity analysis using stream sampling and near infrared spectroscopy. AAPS PharmSciTech [Internet]. 2002;3(3):E24. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF02830622>
47. El-Hagrasy AS, Morris HR, D'Amico F, Lodder RA, Drennen JK. Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity. J Pharm Sci [Internet]. 2001;90(9):1298–307. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.1082>
48. El-Hagrasy AS, D'Amico F, Drennen JK. A process analytical technology approach to near-infrared process control of pharmaceutical powder blending. Part I: D-optimal design for characterization of powder mixing and preliminary spectral data evaluation. J Pharm Sci [Internet]. 2006;95(2):392–406. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.20467>
49. Reich G. Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2005;57(8):1109–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.020>
50. Wargo DJ, Drennen JK. Near-infrared spectroscopic characterization of pharmaceutical powder blends. J Pharm Biomed Anal [Internet]. 1996;14(11):1415–23. Available from: [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(96\)01739-6](https://doi.org/10.1016/0731-7085(96)01739-6)
51. Pasquini C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. J Braz Chem Soc [Internet]. 2003;14(2):198–219. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532003000200006>
52. Leitão TMD. Aplicações da espectroscopia de infravermelho próximo em Ciências Farmacêuticas. Univ Fernando Pessoa. 2012;
53. Mantanus J. New Pharmaceutical Applications Involving Near Infrared Spectroscopy as a PAT Compliant Process Analyzer. PhD Thesis, Univ Liege, Fac Med Belgium. 2012;
54. Ganzoury MA, Allam NK, Nicolet T, All C. Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry. Renew Sustain Energy Rev [Internet]. 2015;50:1–8. Available from: <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.073>
55. Vila Real CP de M. Estudo de métodos analíticos alternativos para quantificação do teor de cálcio, ferro e vitamina C em pré-misturas enriquecidas em micronutrientes. Universidade Católica Portuguesa; 2014.

56. Frank IE, Kowalski BR. Chemometrics. *Anal Chem* [Internet]. 1982;54(5):232–43. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac00242a023>
57. Eigenvector. Cluster - Eigenvector Documentation Wiki [Internet]. [cited 2017 Sep 18]. Available from: <http://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Cluster>
58. The United States Pharmacopeial Convention. Propylene glycol. In: United States Pharmacopeia–National Formulary [Internet]. 2010. Available from: http://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/propyleneGlycol.pdf
59. Clariant Ltd. Lanogen® 1500 - CLARIANT [Internet]. Clariant Ltd.; [cited 2017 Sep 23]. Available from: <https://www.clariant.com/pt/Solutions/Products/2014/06/23/16/13/Lanogen-1500>
60. Workman J, Weyer L. *Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy*. Florida, EUA: CRC Press; 2007.
61. Kogermann K. *Understanding solid-state transformations during dehydration : new insights using vibrational spectroscopy and multivariate modelling*. Universidade de Helsinquia; 2008.
62. Krzyzaniak JF, Williams GR, Ni N. Identification of phase boundaries in anhydrate/hydrate systems. *J Pharm Sci* [Internet]. 2007;96(5):1270–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.20941>
63. Jørgensen AC, Airaksinen S, Karjalainen M, Luukkonen P, Rantanen J, Yliruusi J. Role of excipients in hydrate formation kinetics of theophylline in wet masses studied by near-infrared spectroscopy. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2004;23(1):99–104. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.06.001>

Anexos

Anexo A

Nas tabelas seguintes é apresentado a composição dos ensaios utilizados na elaboração desta dissertação.

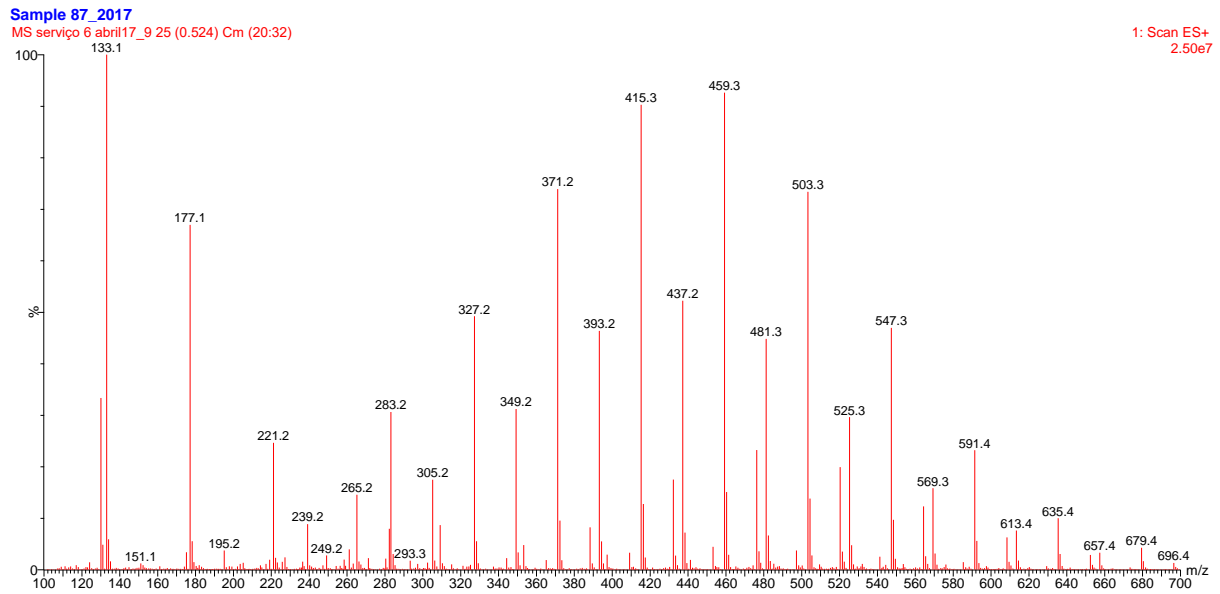
Ensaio	PEG400 [%]	PEG3350 [%]	PEG4000 [%]	Propilenoglicol [%]
ACY115	57,00	-	38,00	-
ACY116	54,72	-	36,48	3,80
ACY117	54,72	36,48	-	3,80
ACY119	57,00	38,00	-	-

Ensaio	PEG 300 [%]	PEG 1500 [%]	Aciclovir micronizado [%]
ACY121	54,75	40,00	5,25
ACY122	45,00	50,00	5,00
ACY123	55,25	40,00	4,75
ACY124	45,00	50,00	5,00
ACY125	35,25	60,00	4,75
ACY126	45,00	50,00	5,00
ACY127	34,75	60,00	5,25

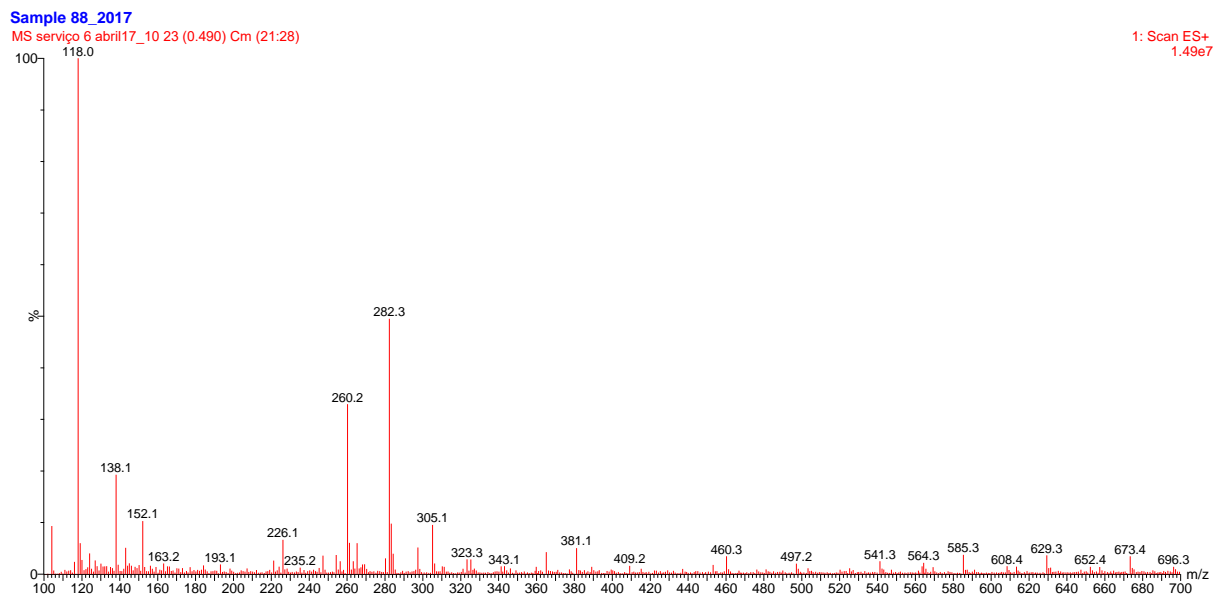
Ensaio	PEG 300 [%]	PEG 1500 [%]	Aciclovir micronizado [%]
ACY128	54,75	40,00	5,25
ACY129	57,89	42,11	0,00
ACY130	47,37	52,63	0,00
ACY131	52,63	47,37	0,00
ACY132	50,00	50,00	0,00

Anexo B

Nas figuras seguintes são apresentadas as ampliações dos espectros de massa de ionização por electrospray, utilizados na elaboração desta dissertação.



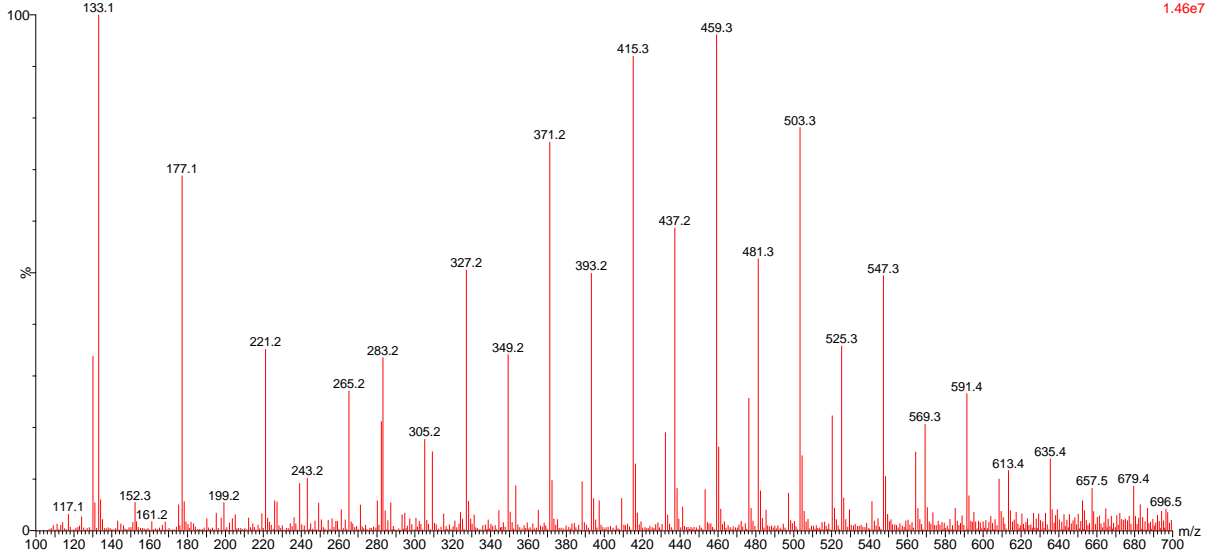
Espectro de massa do PEG400 para a janela de 100m/z - 700m/z



Espectro de massa do Aciclovir para a janela de 100m/z - 700m/z

Sample 84_2017
MS serviço 6 abril17_6 27 (0.558) Cm (17:41)

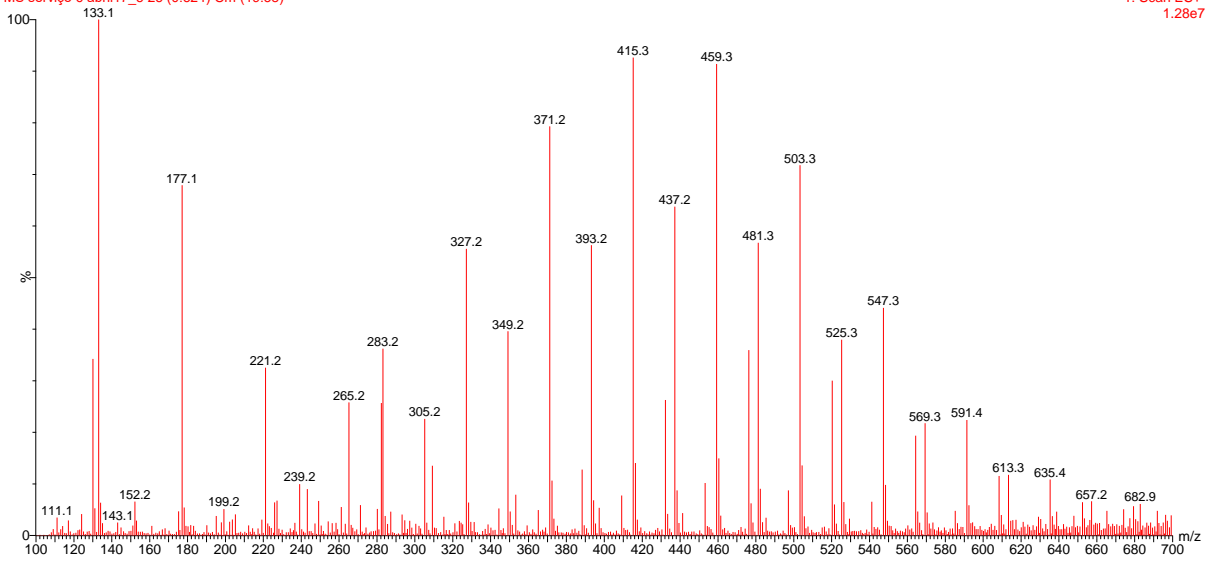
1: Scan ES+
1.46e7



Espectro de massa do ensaio ACY116 para a janela de 100m/z - 700m/z

Sample 83_2017
MS serviço 6 abril17_5 25 (0.524) Cm (19:38)

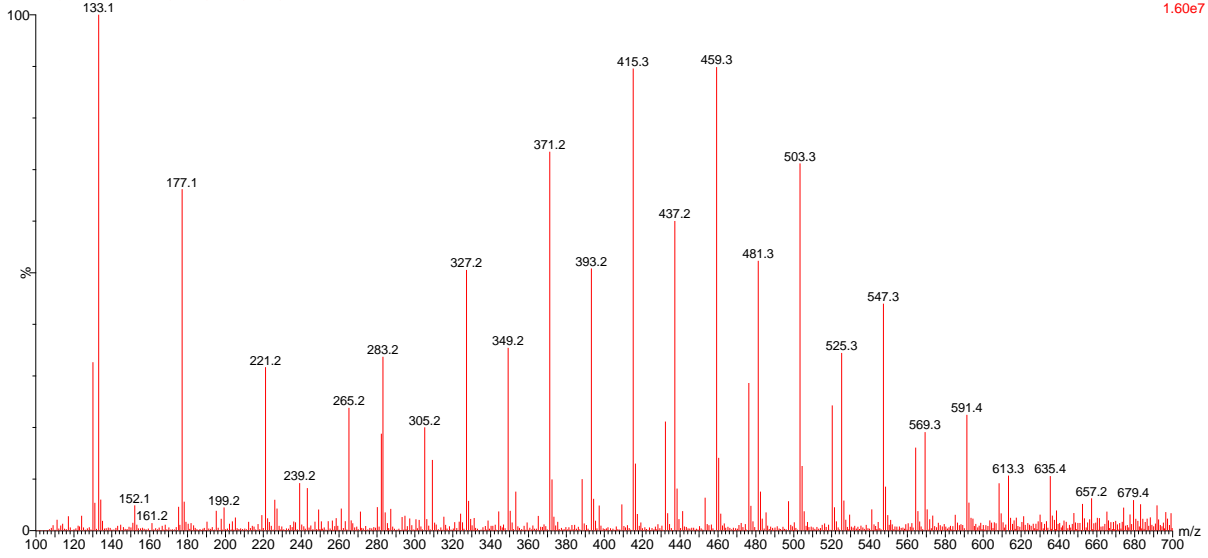
1: Scan ES+
1.28e7



Espectro de massa do ensaio ACY117 para a janela de 100m/z - 700m/z

Sample 85_2017
MS serviço 6 abril17_7 24 (0.507) Cm (20:33)

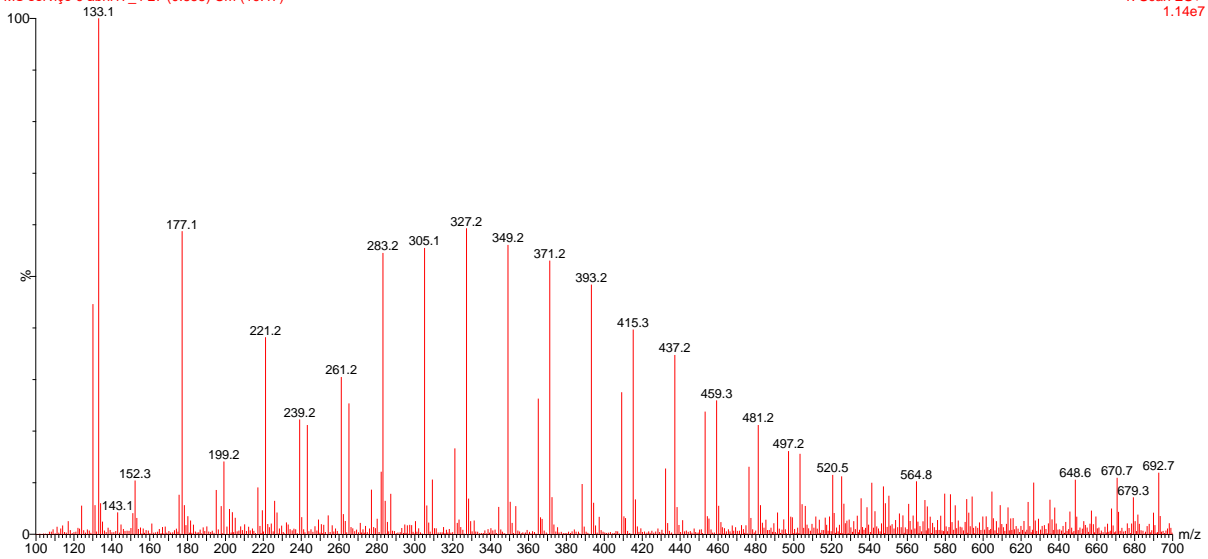
1: Scan ES+
1.60e7



Espectro de massa do ensaio ACY119 para a janela de 100m/z - 700m/z

Sample 82_2017
MS serviço 6 abril17_4 27 (0.558) Cm (16:47)

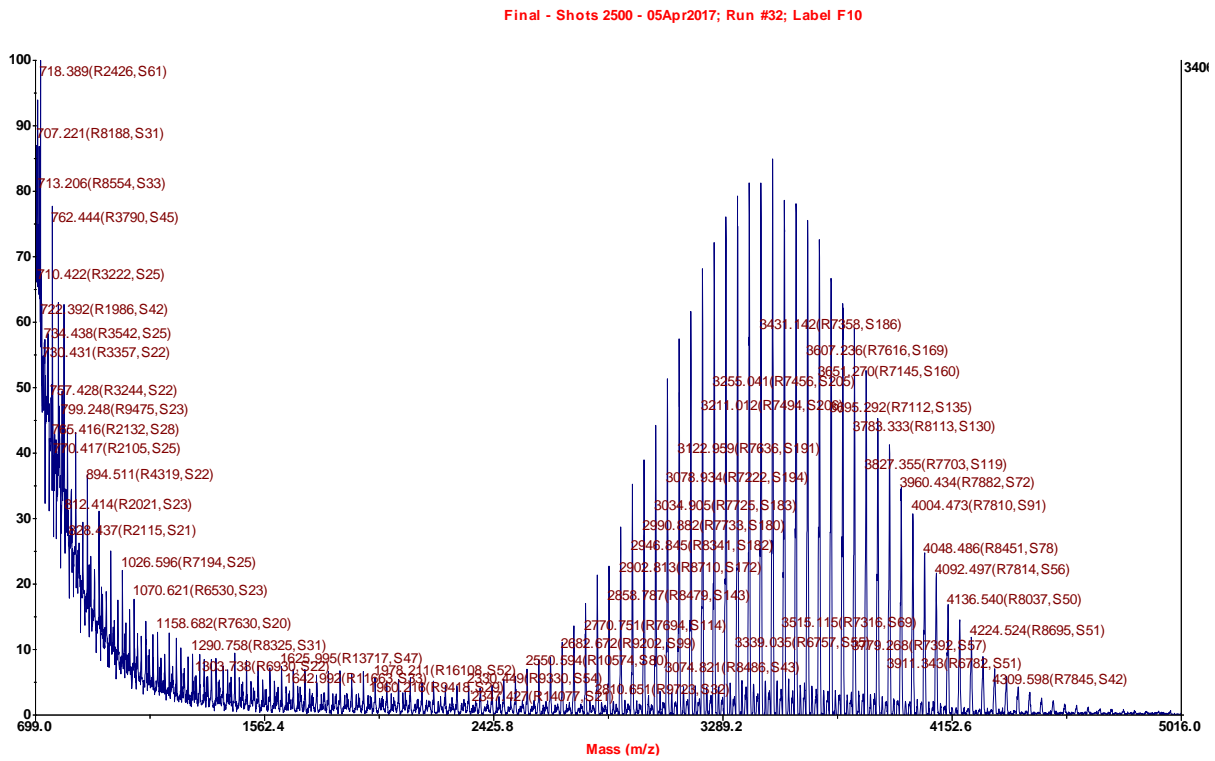
1: Scan ES+
1.14e7



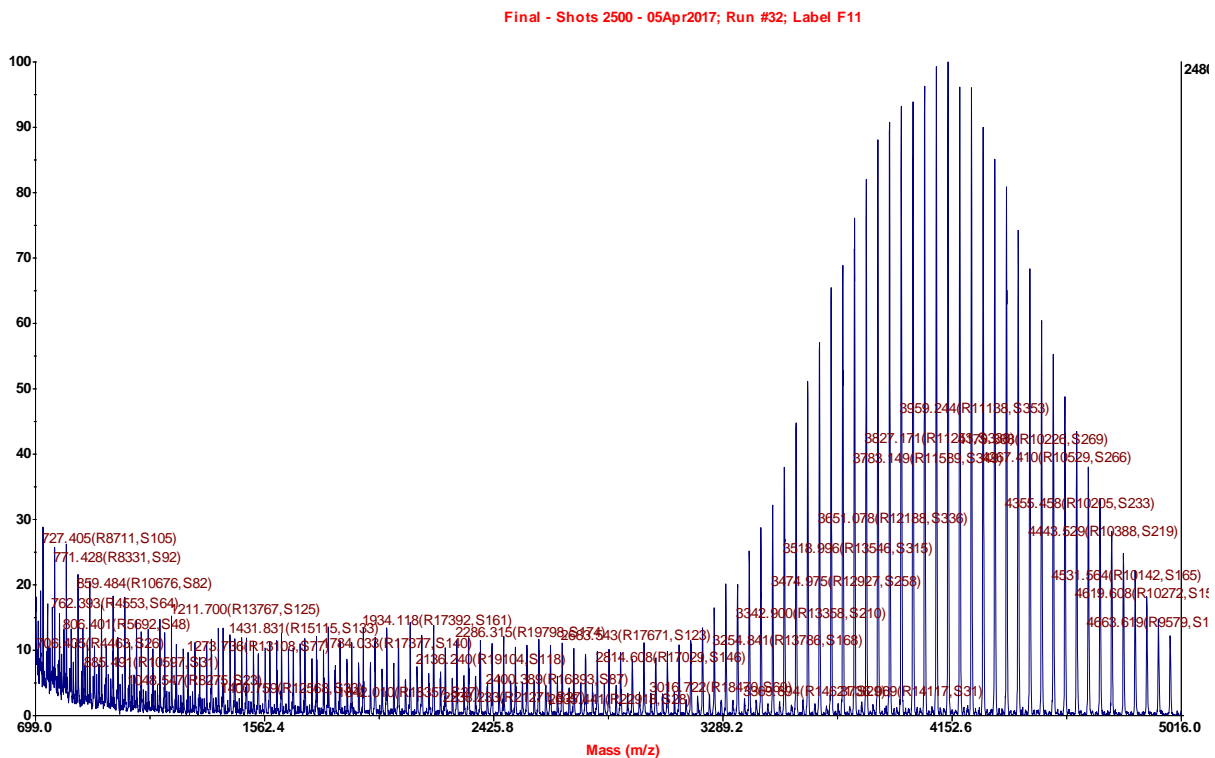
Espectro de massa do Lote 8072471 para a janela de 100m/z - 700m/z

Anexo C

Nas figuras seguintes são apresentadas as ampliações dos espectros de massa de ionização por desorção a laser assistida por matriz, utilizados na elaboração desta dissertação.

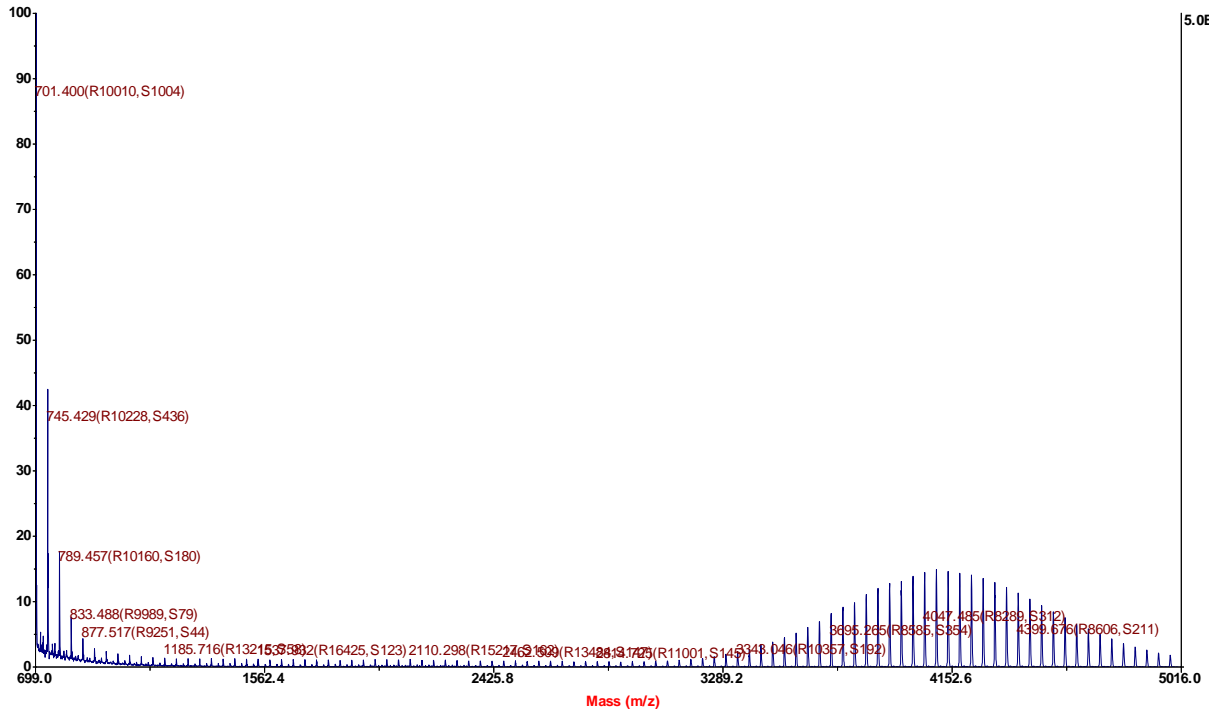


Espectro de massa do PEG3350 para a janela de 700m/z - 5000m/z



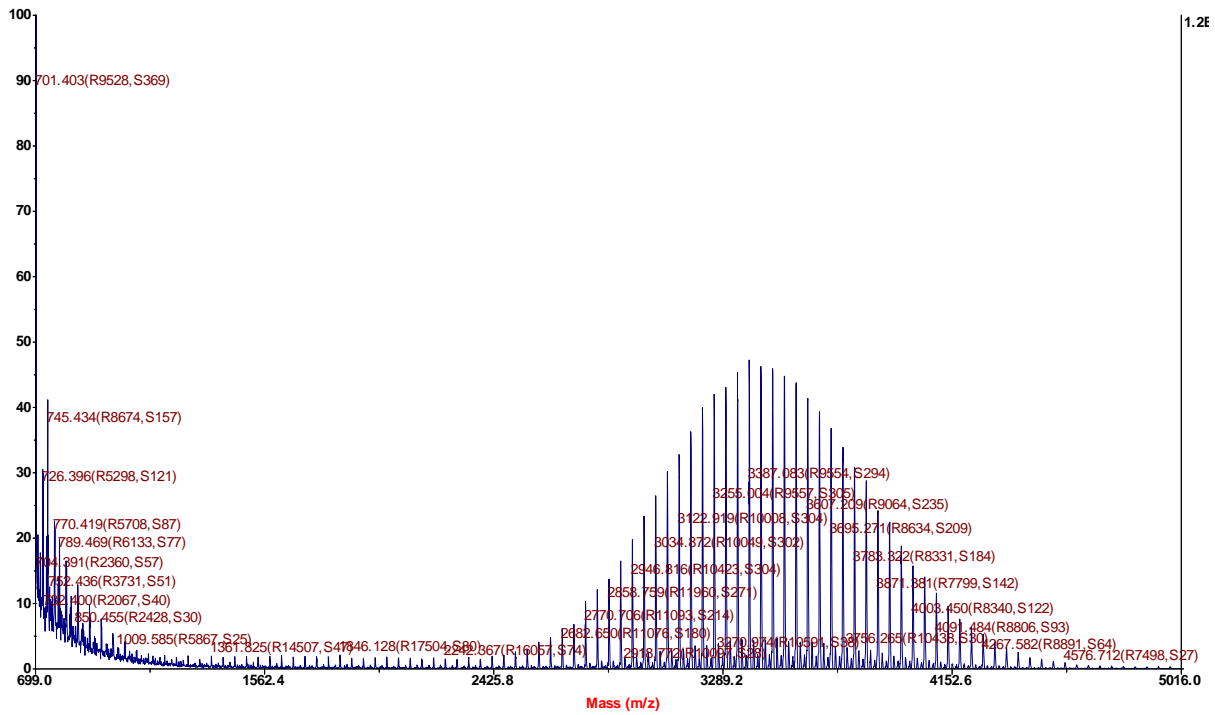
Espectro de massa do PEG4000 para a janela de 700m/z - 5000m/z

Final - Shots 2500 - 05Apr2017; Run #32; Label F7

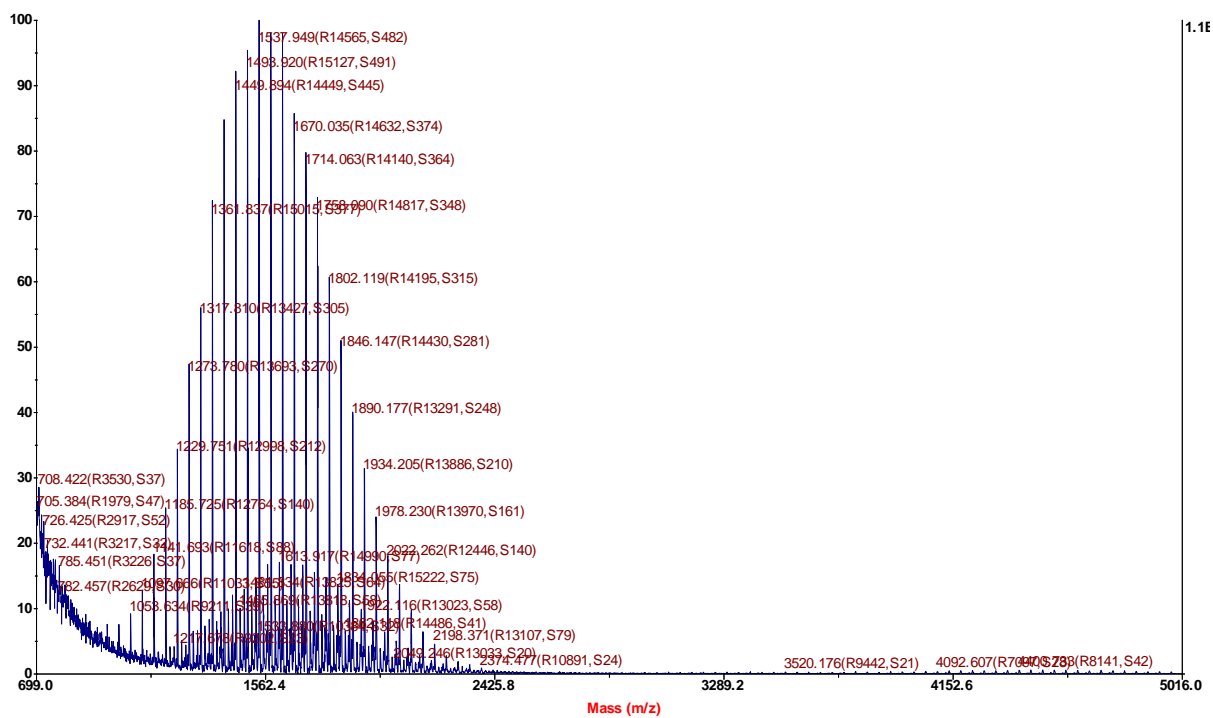


Espectro de massa do ensaio ACY115 para a janela de 700m/z - 5000m/z

Final - Shots 2500 - 05Apr2017; Run #32; Label F8



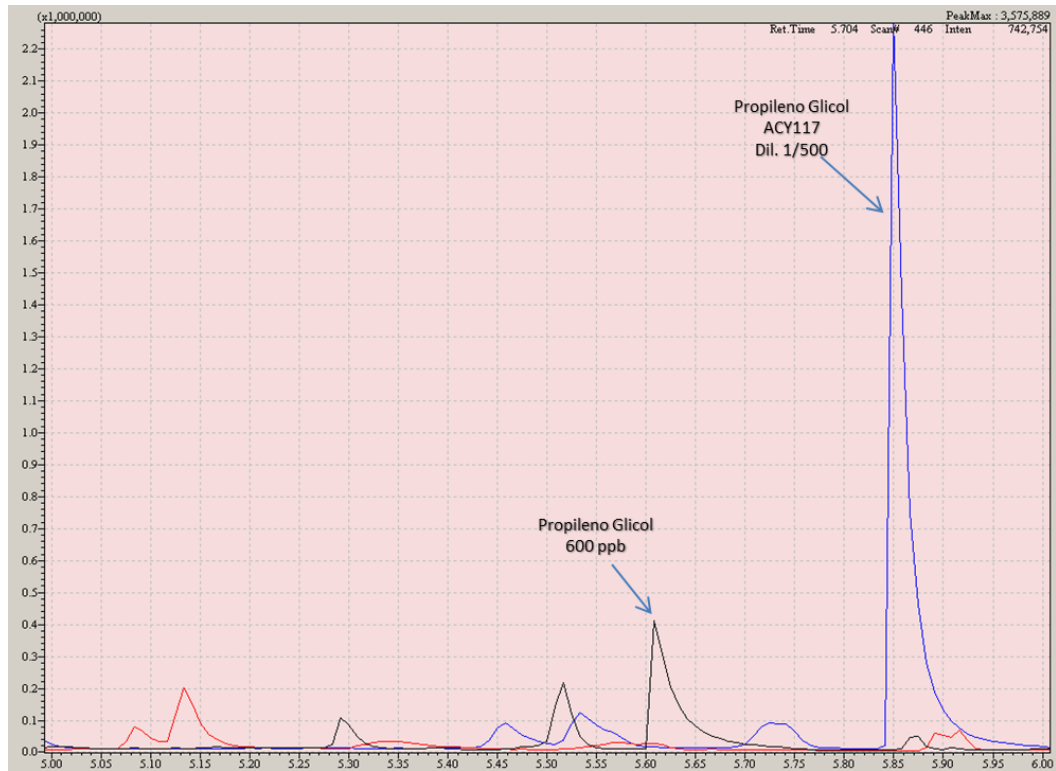
Espectro de massa do ensaio ACY119 para a janela de 700m/z - 5000m/z



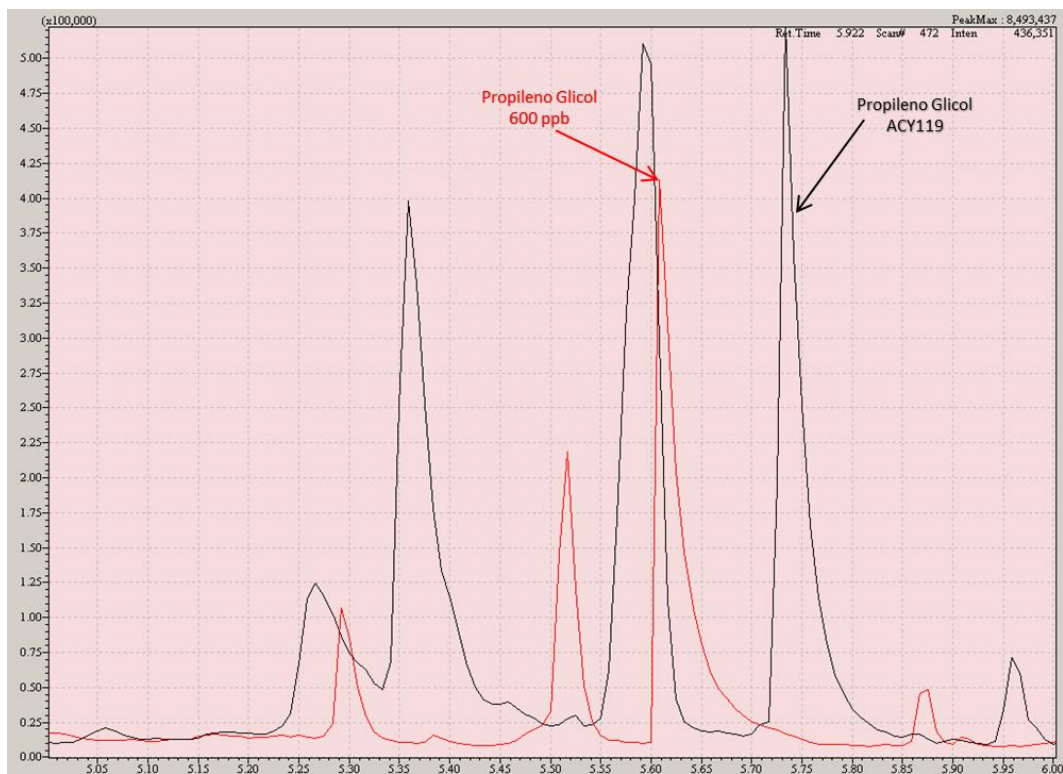
Espectro de massa do Lote 8092267 para a janela de 700m/z - 5000m/z

Anexo D

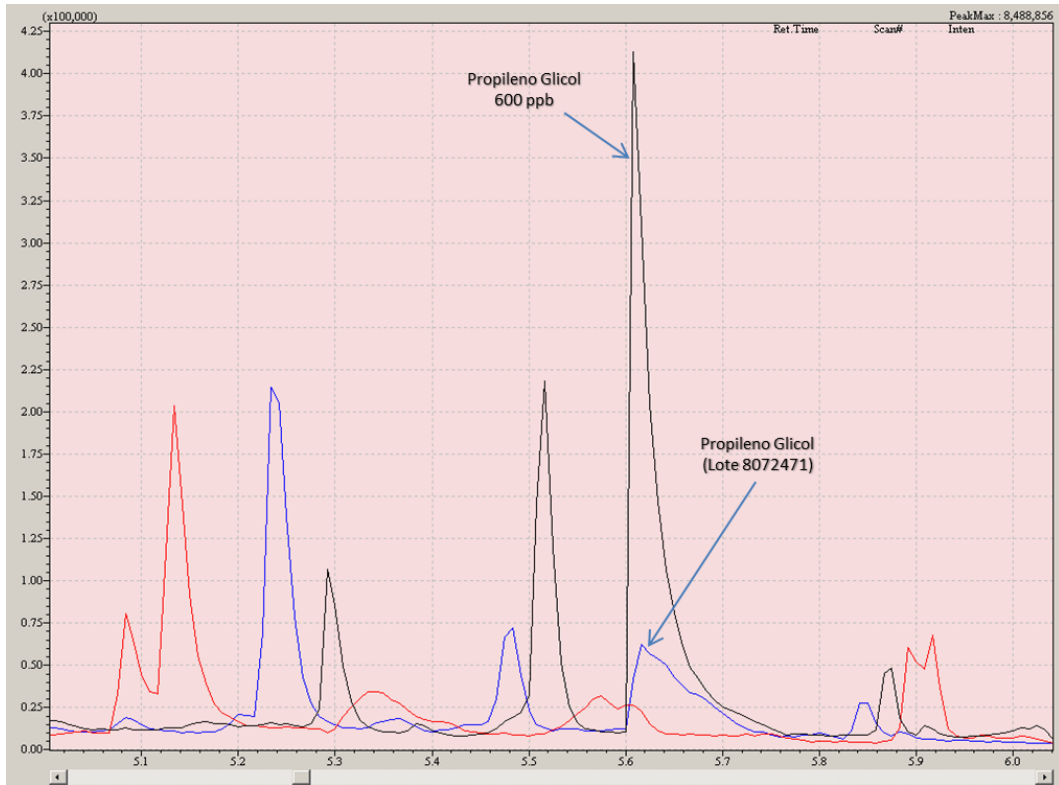
Nas figuras seguintes são apresentadas as ampliações dos cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa, utilizados na elaboração desta dissertação.



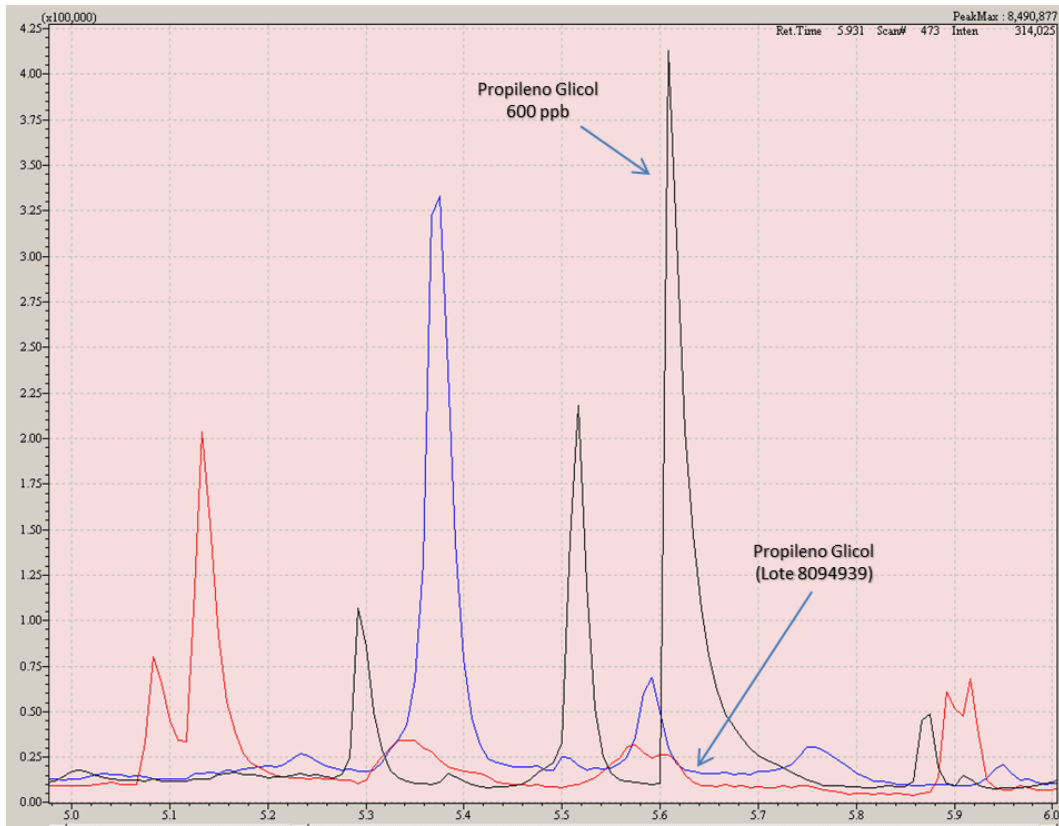
Cromatograma do ensaio ACY117



Cromatograma do ensaio ACY119



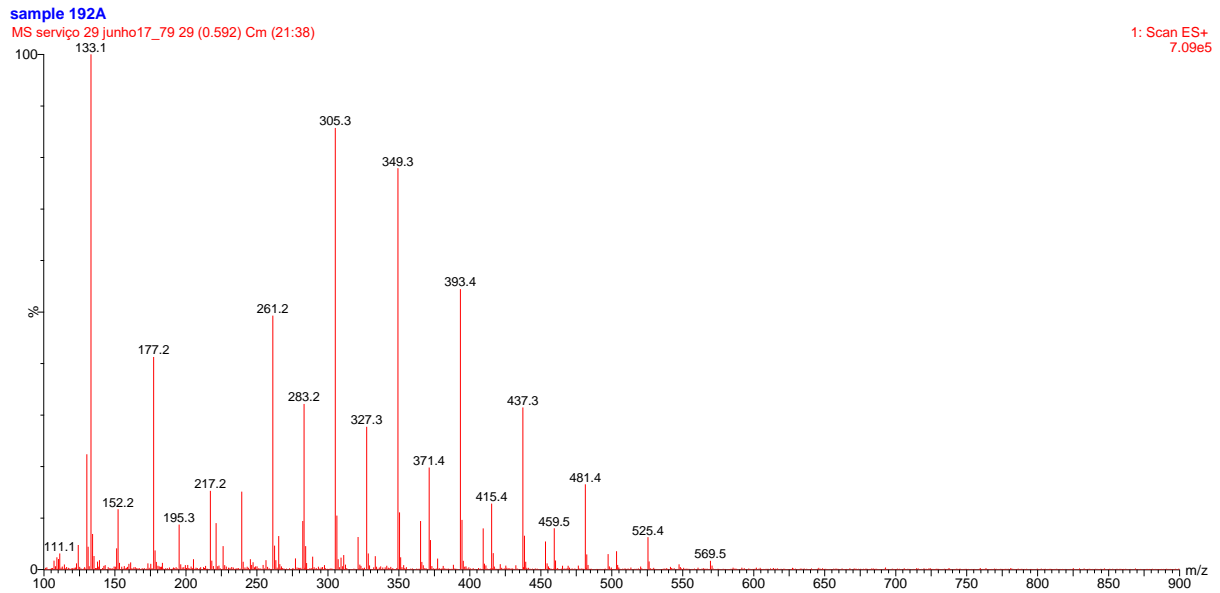
Cromatograma do lote 8072471



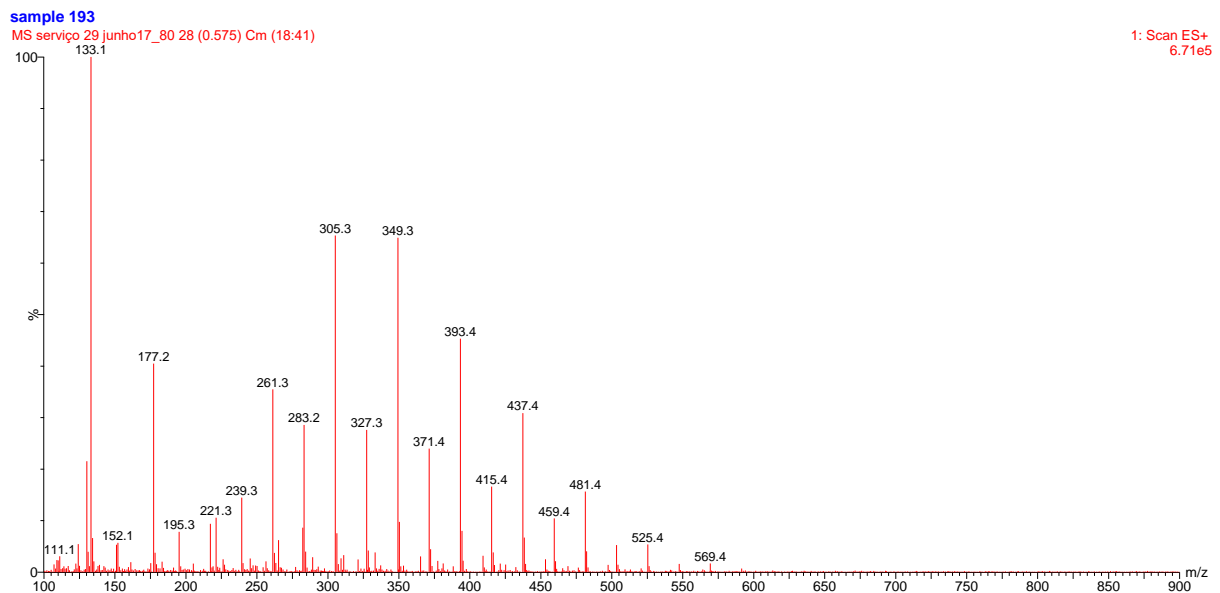
Cromatograma do lote 8094939

Anexo E

Nas figuras seguintes são apresentadas as ampliações dos espectros de massa de ionização por electrospray e de ionização por dessorção a laser assistida por matriz, para confirmação qualitativa, utilizados na elaboração desta dissertação.

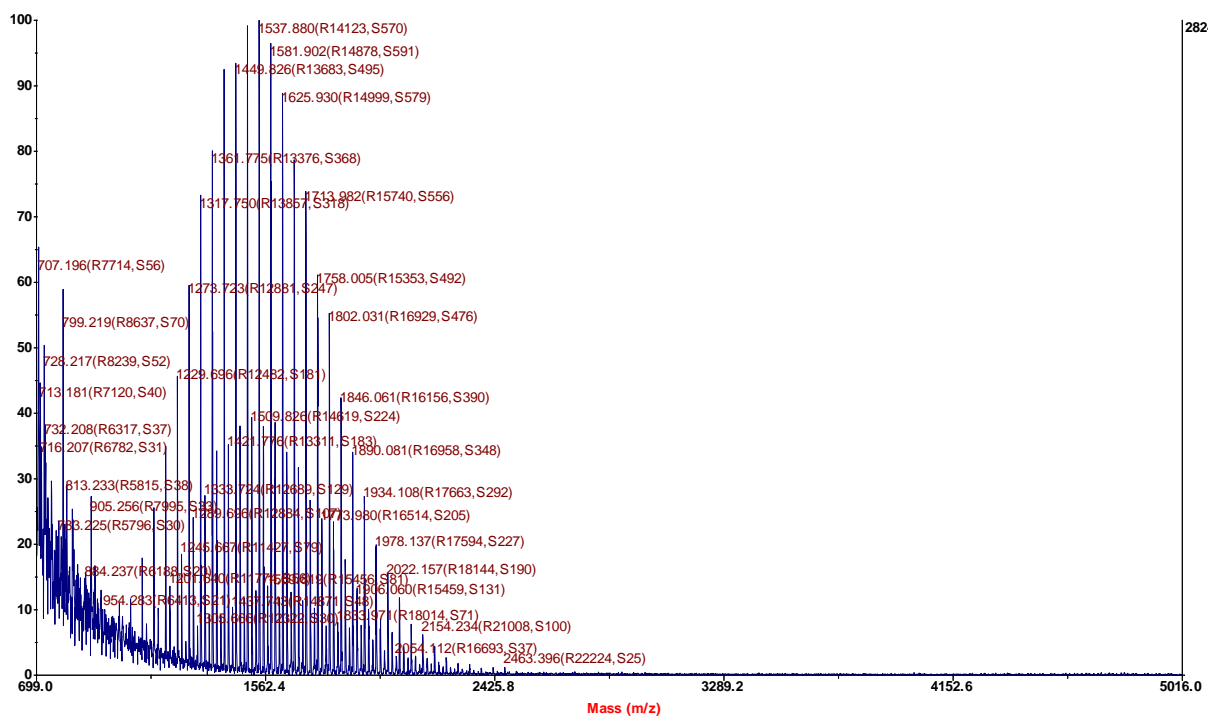


Espectro de massa do ensaio ACY124, por ESI, para a janela de 100m/z - 900m/z



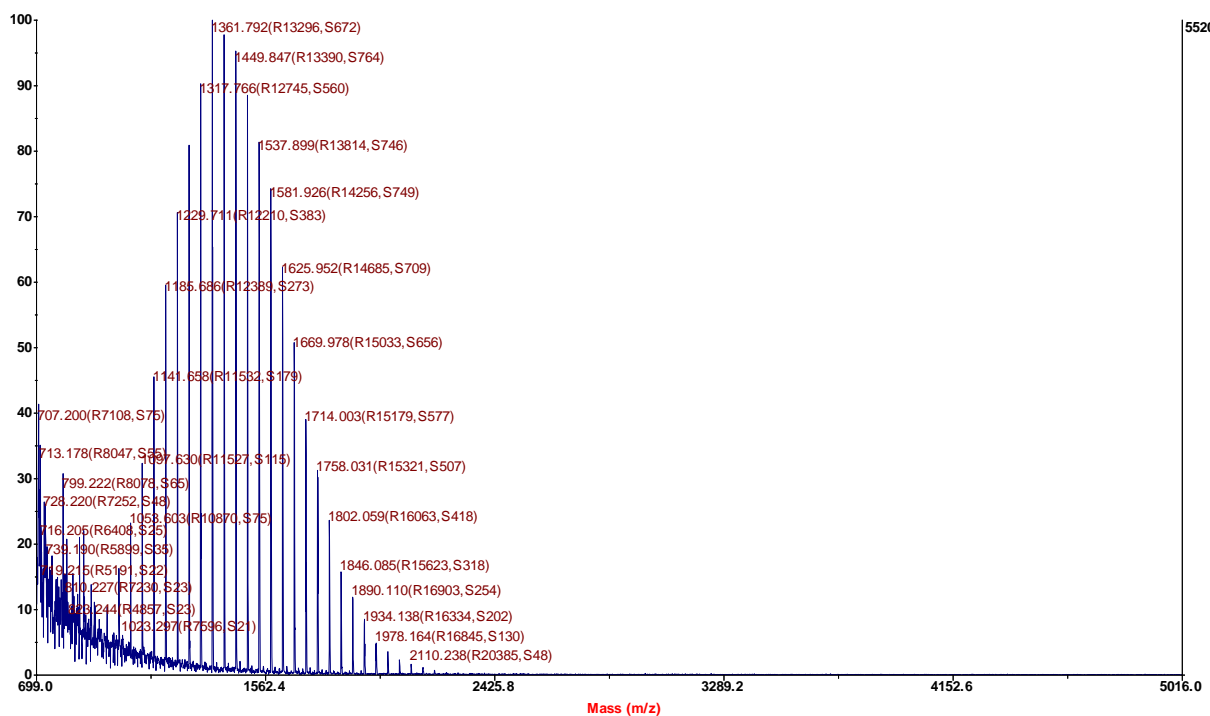
Espectro de massa do lote 8094939, por ESI, para a janela de 100m/z - 900m/z

Final - Shots 2500 - 05Apr2017; Run #79; Label K10



Espectro de massa do ensaio ACY124, por MALDI, para a janela de 700m/z - 5000m/z

Final - Shots 2500 - 05Apr2017; Run #79; Label K9



Espectro de massa do lote 8094939, por MALDI, para a janela de 700m/z - 5000m/z