

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL - MG

GLEYSSON DE PAULA TERRA

ESTUDOS DO EFEITO ESTABILIZANTE DOS EXCIPIENTES EM PANCREATINA

**Alfenas/ MG
2015**

GLEYSSON DE PAULA TERRA

ESTUDOS DO EFEITO ESTABILIZANTE DOS EXCIPIENTES EM PANCREATINA

Trabalho apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Jerusa Simone Garcia Trevisan

Coorientador: Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan

**Alfenas/ MG
2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Terra, Gleysson de Paula.

Estudo do efeito estabilizante dos excipientes em pancreatina. /
Gleysson de Paula Terra. -- Alfenas/MG, 2015.
72 f.

Orientadora: Jerusa Simone Garcia Trevisan.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas,
Alfenas, MG, 2015.
Bibliografia.

1. Produtos biológicos. 2. Teste de esforço. 3. Estabilidade.
4. Espectrofotometria. I. Trevisan, Jerusa Simone Garcia. II. Título.

CDD-543

Gleysson de Paula Terra

**“Estudo do efeito estabilizante
dos excipientes em pancreatina”**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovado em: 27/11/15

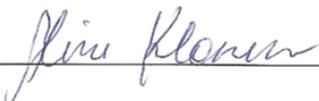
Profa. Dra. Jerusa Simone Garcia Trevisan
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Profa. Dra. Aline Klassen
Instituição: UNIFESP

Assinatura:  _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, saúde e força para enfrentar os obstáculos.

Agradeço à Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade de realizar este trabalho.

À minha orientadora Prof.^a. Dr.^a. Jerusa Simone Garcia e ao meu coorientador Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan.

À minha família pelo amor e o apoio incondicional nesta etapa de nossas vidas.

À FAPEMIG, CNPQ e CAPES.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Acre – IFAC – AC.

Aos demais professores e funcionários da UNIFAL-MG que de alguma forma tenham contribuído na execução deste trabalho.

Aos colegas do LACFar, especialmente ao Marcus e à Fernanda, que muito me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disposição em avaliar meu trabalho e contribuir com suas correções e críticas.

A todos, que mesmo não citados, puderam contribuir de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Imagine uma nova história para sua vida e acredite nela”.
(Paulo Coelho)

RESUMO

A pancreatina é um produto biotecnológico que contém um complexo enzimático obtido do pâncreas suíno, constituído principalmente pela amilase, lipase e protease. A literatura ainda apresenta poucos dados relacionados à estabilidade da pancreatina em formulações. Desta forma, foram realizados experimentos relativos à estabilidade usando o medicamento comercial Creon 10.000 e também o padrão de pancreatina puro e suas misturas binárias empregando 6 excipientes na proporção de 1:1 (m/m). Para isso, as amostras foram armazenadas durante 1, 3 e 6 meses em câmara de estabilidade a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de umidade relativa e a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ na ausência de umidade. Foram realizados ainda testes de estresse em 5 condições (alta temperatura, pH ácido, pH básico, luz ultravioleta e oxidação forçada) para avaliar o efeito destes fatores na atividade das 3 enzimas que compõe o complexo. O resultado da atividade da α -amilase (%) nas amostras secas armazenadas por 1 mês, mostrou que a sacarose e o manitol foram os que apresentaram menor interação com a enzima sendo observado uma atividade de $78,6 \pm 0,9$ e $68,2 \pm 0,6$, respectivamente. Já a atividade da protease (%) nas amostras armazenadas nas mesmas condições descritas anteriormente, mostrou que a celulose foi o excipiente de menor interação com a enzima (atividade de $11,0 \pm 0,5$). Em relação à lipase (%), o estearato de magnésio foi o excipiente de menor interação com esta enzima apresentando uma atividade de $66,0 \pm 0,8$. Por outro lado, a umidade apresentou-se como um fator de forte influência na perda de atividade da α -amilase e protease, porém a atividade da lipase não foi significativamente afetada ($88,8 \pm 0,9\%$ na mistura com sacarose). O estudo no biofármaco Creon 10.000, mostrou uma diminuição significativa da atividade da α -amilase (68%), lipase (77%) e protease (58%) nas amostras em pó armazenadas por 3 meses à 40°C e 0% de umidade relativa. Nos resultados dos testes de estresse foi observado que o pH 9,0 e a luz UV não provocaram alterações significativas na atividade da α -amilase. Por outro lado, a lipase sofreu perdas consideráveis de atividade (inferiores a 32%) em todas as condições avaliadas. Os dados mostraram que características dos excipientes e condições de armazenamento afetam a estabilidade da enzima e, conseqüentemente, sua atividade. Todas as amostras geradas neste trabalho foram analisadas empregando-se espectrofotometria UV/Vis, que é uma técnica recomendada pelo ICH para avaliação de estabilidade de biofármacos.

Palavras chave: Biofármaco. Teste de Estresse. Estabilidade. Espectrofotometria UV/Vis.

ABSTRACT

Pancreatin is a biotechnological product containing an enzyme complex obtained from porcine pancreas, constituted mainly by amylase, lipase and protease that are used for digestive treatment. In literature, a few data related to pancreatin stability in pharmaceutical formulations is available. Thus, experiments were performed concerning the stability of the commercial product "Creon 10,000", standard pancreatin and its binary mixtures with 6 excipients in the proportion of 1:1 (w/w). In order to accomplish these goals, the samples were subjected to storage during 1, 3 and 6 months using stability camera under two different conditions: at $40 \pm 1^\circ\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ relative humidity and $40 \pm 1^\circ\text{C}$ in absence of moisture. Stress testing on 5 conditions (high temperature, acidic pH, alkaline pH, ultraviolet light and forced oxidation) was also performed. In these cases, the consequences in all three enzymes activity were evaluated. α -Amylase activity in samples stored for 1 month in absence of moisture has showed that saccharose and mannitol are the excipients that interact in lower levels with this enzyme (activity of $78.6 \pm 0.9\%$ and $68.2 \pm 0.6\%$, respectively). The protease activity in same condition described previously, has showed cellulose as the excipient that presents minor interaction with this enzyme (activity of $11.0 \pm 0.5\%$ was found). Regarding to lipase activity, the magnesium stearate exhibited inferior interaction with this enzyme, once it preserved $66.0 \pm 0.8\%$ of activity level. Humidity showed itself as a strong influencing factor in the reduction of α -amylase and protease activities; however, the lipase activity was not significantly affected ($88.8 \pm 0.9\%$ in the mixture with saccharose). The enzymatic stability study of the biopharmaceutical Creon 10.000 as powdered samples, after 3 months of storage at 40° and 0% relative humidity showed a significant decrease in activity for α -amylase (68%), lipase (77%) and protease (58%). Through the stress testing, it could be observed that pH 9.0 and UV light did not induce great alterations in the α -amylase activities. On the other hand, the lipase suffered considerable activity decrease under all conditions evaluated (less than 32%). The results reveal that the excipients characteristics as well as the storage conditions affect the enzymes stability and consequently their activities. In these works, all samples generated were analysed employing spectrophotometry UV/Vis, which is recommended by the ICH for stability studies of biopharmaceuticals products.

Key words: Biopharmaceutical. Stress Testing. Stability. Spectrophotometry UV/Vis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitro salicílico
DP	Desvio padrão
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m/m	Massa/massa
m/v	Massa/volume
ND	Não detectado
pNPP	Palmitato de p-nitrofenila
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
Tris/HCl	Tris(hidroximetil)aminometano
U/mL	Unidades de atividade enzimática/mL
USP	United States Pharmacopeia
UV/Vis	Ultravioleta/Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo catalítico das amilases.....	19
Figura 2 - Mecanismo catalítico da lipase.....	22
Figura 3 - Reação catalítica da enzima α -amilase e redução do reagente DNS.....	37
Figura 4 - Reação de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila catalisada por lipase.....	38
Figura 5 - Reação representa a clivagem de uma ligação éster.....	39
Figura 6 - Curva analítica de glicose usada para análise da atividade de α -amilase.....	43
Figura 7 - Curva analítica para análise da lipase.....	43
Figura 8 - Curva analítica para análise da protease.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limite detecção e limite de quantificação da atividade enzimática.	45
Tabela 2 - Atividade da α -amilase nas amostras de pancreatina a 40°C e 75% de umidade relativa.	47
Tabela 3 - Atividade da α -amilase nas amostras de pancreatina a 40°C e 0% de umidade relativa.	48
Tabela 4 - Atividade da lipase nas amostras de pancreatina a 40°C e 75% de umidade relativa.	51
Tabela 5 - Atividade da lipase nas amostras de pancreatina a 40°C e 0% de umidade relativa.	52
Tabela 6 - Atividade da protease nas amostras de pancreatina a 40°C e 75% de umidade relativa.	55
Tabela 7 - Atividade da protease nas amostras de pancreatina a 40°C e 0% de umidade relativa.	56
Tabela 8 - Resultados dos valores das curvas analíticas para determinação das atividades das três enzimas.	57
Tabela 9 - Atividade da α -amilase nas amostras do biofármaco Creon 10.0000.	58
Tabela 10 - Atividade da lipase nas amostras do biofármaco Creon 10.0000.	59
Tabela 11 - Atividade da protease nas amostras do biofármaco Creon 10.0000.	60
Tabela 12 - Dados das curvas analíticas.	62
Tabela 13 - Resultados da atividade de α -amilase nas amostras submetidas.	63
Tabela 14 - Resultados da atividade de lipase nas amostras.	63
Tabela 15 - Resultados da atividade de protease nas amostras.	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	BIOFÁRMACOS	15
2.2	PANCREATINA	16
2.2.1	α-amilase	18
2.2.2	Lipase	19
2.2.3	Protease.....	22
2.3	ESTUDOS DE ESTABILIDADE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS	23
2.4	EXCIPIENTES	25
2.5	ESPECTROFOTOMETRIA UV/Vis EM ESTUDOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	27
3	OBJETIVOS	29
4.1	PREPARO DAS AMOSTRAS	31
4.1.1	Padrão de pancreatina e misturas binárias.....	31
4.1.2	Amostra comercial de medicamento contendo pancreatina.....	32
4.2	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	33
4.3	REAGENTES E SOLUÇÕES	33
4.4	TESTE DE ATIVIDADE PARA α -AMILASE	35
4.5	TESTE DE ATIVIDADE PARA LIPASE.....	37
4.6	TESTE DE ATIVIDADE PARA PROTEASE	38
4.7	TESTES DE ESTRESSE.....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42

5.1	RESULTADOS OBTIDOS NOS TESTES COM PANCREATINA PURA E MISTURAS BINÁRIAS COM EXCIPIENTES.....	42
5.1.1	Curvas analíticas, limite de detecção e limite de quantificação.....	42
5.1.2	Atividade da enzima α -amilase.....	45
5.1.3	Atividade da enzima lipase	49
5.1.4	Atividade da enzima protease.....	53
5.2	RESULTADOS DOS TESTES DE ATIVIDADE NO BIOFÁRMACO CREON 10.000.....	57
5.2.1	Atividade da enzima α -amilase.....	57
5.2.2	Atividade da enzima lipase	59
5.2.3	Atividade da enzima protease.....	60
5.3	RESULTADOS DE ATIVIDADE DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS AO TESTE DE ESTRESSE.....	61
5.3.1	α -amilase.....	62
5.3.2	Lipase	63
5.3.3	Protease.....	64
6	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

A estabilidade de produtos farmacêuticos é definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria prima pura, mantém dentro dos limites explicitados e durante todo o tempo de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando na época de sua fabricação (SILVA et al., 2009).

A estabilidade dos produtos farmacêuticos depende de vários fatores, entre eles os ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros fatores relacionados ao próprio produto como as propriedades físico-químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2008).

Dentre os produtos farmacêuticos, destacam-se aqueles denominados biofármacos que são definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como sendo um produto que tem como princípio ativo substância de origem biológica. Por apresentarem elevada complexidade, aos biofármacos são aplicados estudos de estabilidade preconizados pela ANVISA como a qualquer outra classe de produto medicamentoso. Esses testes são projetados visando determinar o prazo de validade, o período de utilização e as condições de armazenamento. Durante as várias etapas de fabricação desses biofármacos pode ocorrer a formação de agregados e produtos de degradação, que por sua vez, comprometem a estabilidade, a qualidade e segurança das formulações (SILVA et al., 2009). Sendo assim, o uso de métodos analíticos se faz necessário para a caracterização e quantificação do produto biológico com o objetivo de garantir a integridade do medicamento.

A pancreatina, princípio ativo alvo deste estudo, é um biofármaco obtido a partir do pâncreas suíno. Segundo a farmacopeia americana (USP), a pancreatina (pó amorfo de coloração creme) é definida como sendo uma substância que contém enzimas, principalmente α -amilase, lipase e protease. Por ser de natureza proteica, a pancreatina só deve ser administrada em comprimidos ou cápsulas gastroresistentes ou com cobertura entérica para atuar no nível intestinal. Caso contrário, a pancreatina seria inativada pela secreção gástrica ácida. Na insuficiência pancreática, o uso destas enzimas pode diminuir a esteatorréia (presença de gordura nas fezes) e normalizar o equilíbrio de nitrogênio ao corrigir a perda proteica por má digestão. Sua maior atividade se dá em meios neutros ou levemente alcalinos.

Neste trabalho foram realizados experimentos relativos à estabilidade usando o biofármaco puro e suas misturas binárias com diferentes excipientes na proporção de 1:1 m/m

e também foi avaliada a estabilidade do medicamento comercial contendo pancreatina denominado Creon 10000. Para isso, as amostras foram submetidas ao armazenamento durante um, três e seis meses em câmara de estabilidade acelerada a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de umidade relativa e a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ na ausência de umidade.

As atividades das enzimas nas amostras foram analisadas empregando-se testes espectrofotométricos os quais são recomendados pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH) que elaborou guias com orientações sobre a qualidade de produtos biológicos e biotecnológicos.

Para finalizar, nesta dissertação também foram realizados testes de estresse aplicados a pancreatina com posterior determinação da atividade, por espectrofotometria, de cada uma das enzimas que compõe a pancreatina. Neste caso, foram usadas cinco condições, sendo elas, alta temperatura, pH ácido, pH básico, luz ultravioleta e oxidação forçada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Uma revisão bibliográfica a respeito do tema abordado será apresentada a seguir neste trabalho.

2.1 BIOFÁRMACOS

Os medicamentos biológicos ou biofármacos são substâncias terapêuticas homólogas ou que interagem com proteínas humanas. Sua estrutura molecular é extremamente complexa, sendo o componente ativo, heterogêneo, de difícil caracterização e replicação (ROCHE, 2013).

Os biofármacos são produzidos utilizando matéria-prima de origem biológica, obtidos por meio de microrganismo, órgãos e tecidos de origem vegetal ou animal, células ou fluidos de origem humana ou animal; ou por origem biotecnológica gerados por meio de células modificadas geneticamente. Qualquer fármaco cuja produção envolva a presença de microrganismos, organismos geneticamente modificados, substâncias produzidas por organismos geneticamente modificados, substâncias produzidas por organismos vivos, como enzimas é definido como biofármaco (SEKHON, 2010).

Os sistemas de produção disponíveis incluem, entre outros, células mamárias, leveduras, bactérias e a escolha do sistema de produção depende da natureza das proteínas a serem produzidas (RADER, 2008).

A primeira substância farmacêutica produzida pela engenharia genética e aprovada para uso terapêutico, definida como biofármaco, foi a insulina humana sintética feita por tecnologia do DNA recombinante em 1982 comercializada com o nome de Humulin (WALSH, 2003; SEKHON, 2010).

Formas biofarmacêuticas apresentam várias vantagens como alternativa de tratamento efetivo em doenças crônicas e incomuns, oferecem segurança e efeitos colaterais reduzidos, podendo ser produzidas em larga escala por processos biotecnológicos. São exemplos de biofármacos: antibióticos, enzimas, citocinas, fatores sanguíneos, agentes tromboembólicos ativadores dos tecidos, plasminogênios, hormônios como a insulina, fatores de crescimento hematopoiéticos, interferons α , β e γ , vacinas e anticorpos monoclonais entre outros.

Ao se comparar os biofármacos com medicamentos tradicionais, aqueles que empregam proteínas apresentam maior especificidade e atividade mesmo em concentrações relativamente baixas. Estes aspectos têm feito das proteínas produtos indispensáveis no combate à várias doenças humanas (CAHILL, 2001). O uso de macromoléculas, ao invés de moléculas mais simples, se dá, pelo alto grau de especificidade na interação com o sítio ativo. Essa interação é sempre reforçada pela atividade catalítica em nível dificilmente obtido com o uso de moléculas químicas sintéticas (GRIEBENOW, 2009).

Um dos maiores desafios no desenvolvimento de formulações farmacêuticas fazendo uso de proteínas como princípio ativo é lidar com as instabilidades química e física dessas moléculas (SOLÁ; GRIEBENOW, 2009). A instabilidade das proteínas é um dos maiores motivos pelo qual, são administradas, tradicionalmente mais por via parenteral que por via oral, que é normalmente a via de administração para a maioria das formulações. Adiciona-se ainda o fato da estabilidade ser um importante fator durante a fabricação e armazenamento destas formulações contendo proteínas.

2.2 PANCREATINA

A pancreatina é uma substância obtida do pâncreas fresco ou congelado de mamíferos e contém diversas enzimas como a α -amilase, lipase, protease, entre outras. É empregada no tratamento da insuficiência pancreática, dispepsia, pancreatite e esteatorréia. A atividade digestiva da pancreatina é normalmente expressa em termos de atividade amilolítica, lipolítica e proteolítica (O' KEEFE, 2001).

Dentre os biofármacos, destaca-se o uso da pancreatina, que auxilia nos processos de digestão e absorção de nutrientes que envolvem pelo menos 3 fases. A primeira é a fase luminal, em que os alimentos são digeridos no tubo digestivo por enzimas presentes em secreções ou na borda em escova do epitélio intestinal. A segunda fase é a absorptiva, em que há fluxo dos nutrientes do tubo digestivo para o meio interno. Na terceira fase, os nutrientes alcançam a circulação sanguínea (O' KEEFE, 2001).

O pâncreas exerce papel fundamental na fase luminal da digestão, pois secreta, para o intestino, diversas enzimas fundamentais para esta fase. Há grande reserva funcional, sendo que a má-absorção de gordura e proteínas não é aparente até que haja diminuição para menos de 10% na função pancreática exócrina (WALJEE, et al. 2008).

A principal causa de deficiência pancreática exócrina não genética é a pancreatite crônica. Outras causas menos frequentes são os tumores pancreáticos, quando causam obstrução do ducto pancreático, as pancreatectomias totais ou subtotais (OLIVEIRA, 2012).

O quadro clínico típico da má-absorção é a presença de esteatorréia (fezes claras, acinzentadas, volumosas, com cheiro forte, algumas vezes com gotas de gordura visíveis) associada à perda de peso a despeito de uma ingestão nutricional adequada (WALJEE, et al. 2008).

Alguns casos raros apresentam deficiências de vitaminas lipossolúveis, especialmente da vitamina D, com possibilidade de desenvolvimento de osteopenia e osteoporose. O objetivo do tratamento é o controle dos sintomas, principalmente da esteatorréia e da desnutrição. A normalização completa da absorção de gorduras é de difícil alcance na prática clínica, não oferece benefícios adicionais e não depende apenas do aumento progressivo da dose de enzimas. A insuficiência pancreática causa dificuldades na digestão de proteínas e carboidratos, mas o principal problema é a digestão das gorduras alimentares. Portanto, a reposição de lipase em casos de má-absorção de origem pancreática normalmente é suficiente para a melhora dos sintomas má-absortivos descritos, embora a maioria das apresentações comerciais inclua amilase e protease junto com lipase. Estes suplementos enzimáticos são normalmente inativados pelo pH ácido no estômago ou destruídos por proteases. Para superar este problema, existem duas alternativas. A primeira é a associação de enzimas pancreáticas com a supressão da produção ácida através de antagonistas H₂ ou de inibidores da bomba de prótons (O'KEEFE, 2001). A segunda é a utilização de enzimas pancreáticas preparadas para dissolução entérica (dissolução ou solubilização do fármaco em condições fisiológicas e de sua permeabilidade através das membranas do trato gastrintestinal) (WALJEE, et al. 2008). Em casos onde a absorção do fármaco encontra-se reduzida, as duas medidas podem ser utilizadas.

A reposição de enzimas pancreáticas gera uma retroalimentação negativa no estímulo para a secreção pancreática, levando a uma diminuição na pressão nos ductos pancreáticos e, assim, a uma diminuição da dor (RIBELA, 2006). Para isso, recomenda-se o uso da pancreatina na dosagem de 9.000 U a 50.000 U nas 3 principais refeições e 4.500 U a 25.000 U em 2 refeições adicionais. A dose em U é baseada na quantidade de lipase presente na formulação.

De acordo com a Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica (IUB), uma unidade de enzima, unidade internacional (U) é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 micromol de substrato por minuto, nas condições padrão por ela recomendadas.

Segundo o dicionário de especialidades farmacêuticas, as principais empresas que produzem medicamentos que possuam pancreatina em sua formulação são: Akzo Nobel Ltda, Solvay Farma Ltda, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda, Knoll Prods. Quims. Farms. Ltda, Biossintética Farmacêutica Ltda, Merck S.A. e Laboratório Farmacêutico Elofar Ltda. No Brasil os medicamentos são comercializados com variadas apresentações. A forma farmacêutica mais utilizada para administração da pancreatina é a de cápsulas (Cotazym F, Creon, Digerase, Elozima, Nutrizim, Pankreoflat, Pantopept e Panzytrat) mas existem ainda formas líquidas para lentes de contato (Polyzym).

2.2.1 α -amilase

As α -amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais, podendo ser usadas como aditivos em detergentes, e nas indústrias de alimentos, fermentação, papel e têxtil, farmacêutica, médica e química (PANDEY et al. 2000, SOARES, 2010). A α -amilase (1,4- α -glucano-hidrolase) é uma enzima que quebra as ligações α (1,4) dos polissacarídeos com três ou mais unidades de D-glicose. O ataque ocorre em vários pontos da cadeia e os primeiros produtos de hidrólise são oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose.

A classificação das enzimas segundo a Comissão de Enzimas (EC, *Enzyme Committee*) é feita de acordo com a reação por ela catalisada e a essa reação é então atribuído um número EC que a identifica. Para as α -amilases esse número é 3.2.1.1 e a reação é descrita como “endo-hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 em oligossacarídeos e polissacarídeos” (NIELSEN; BORCHERT, 2000).

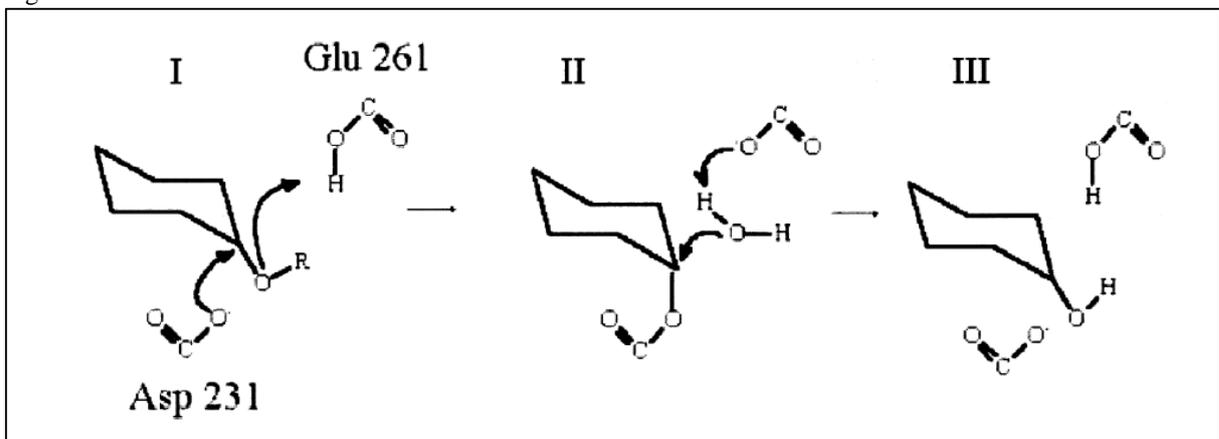
As α -amilases são encontradas em órgãos animais, como o pâncreas e as glândulas salivares, no plasma e na urina humana. São encontradas também em plantas e em microrganismo como fungos, leveduras e bactérias. Alguns insetos também possuem a α -amilase que são fundamentais na digestão e metabolismo de carboidratos (BRENA et al., 1996). Ocorrem amplamente em animais, plantas e microrganismo, entretanto, pela maior facilidade e menor tempo de produção, as microbianas têm a preferência do mercado de enzimas (CELESTINO et al., 2014, REDDY et al., 2004).

O sítio ativo da α -amilase está localizado na região do carbono terminal das fitas β . Por meio de estudos da difração por raio X, descobriu-se que a fenda de ligação ao substrato

pode acomodar de quatro a dez unidades de glicose, que variam de acordo com a origem da α -amilase (NIELSEN; BORCHET, 2000).

O mecanismo catalítico aceito para as amilases foi proposto por Koshland (1953), denominado, dupla substituição. O processo envolve dois resíduos no sítio catalítico, um resíduo de ácido glutâmico e um resíduo de aspartato (VAN DER MAAREL et al., 2002). Este mecanismo consiste em três etapas. A primeira etapa é a protonação do oxigênio da glicose pelo doador de prótons, geralmente um resíduo de glutamato da α -amilase (NIELSEN; BORCHET, 2000). Em seguida, há um ataque nucleofílico catalítico, geralmente por um resíduo de aspartato no carbono C1 da glicose (UITDEHAAG, 1999). Na última etapa há uma ativação de uma molécula de água pelo doador de prótons, o resíduo de glutamato, o qual está desprotonado (NIELSEN; BORCHET, 2000). A molécula de água ativada hidrolisa então a ligação covalente entre o oxigênio do nucleófilo e o carbono C1 da glicose, completando assim o ciclo catalítico (NIELSEN; BORCHET, 2000). A figura 1 exhibe o mecanismo de ação das α -amilases.

Figura 1 - Mecanismo catalítico das amilases.



Fonte : Adaptado de (Nielsen; Borchet, 2000).

Nota : (I) Protonação do oxigênio glicosídico e ataque no carbono C1 da glicose pelo aspartato;
 (II) Ativação da molécula de água, clivagem da ligação covalente entre C1 da glicose e o aspartato;
 (III) Regeneração do estágio inicial de protonação.

2.2.2 Lipase

As lipases (triacilglicerol hidrolase, E.C. 3.1.1.3) são carboxilesterases que catalisam a hidrólise de triglicérides em um meio com uma quantidade de água adequada, resultando em

ácidos graxos livres e glicerol, além de monoglicerídeos e diglicerídeos (BUENO, 2005, DALAI; CHAURASIA; DALAI; SHARNA, 2012;).

Utilizando a técnica de difração de raio X foi possível obter a estrutura tridimensional de algumas lipases, sendo possível então compreender melhor os fatores que determinam seu mecanismo de ação. Fatores estes que tornam as lipases uma das classes de enzimas mais atraentes e utilizadas em aplicações biotecnológicas específicas (SCHRAG et al., 1997).

A partir das informações estruturais foi possível determinar o sítio catalítico da lipase, o qual consiste de três resíduos de aminoácidos (OLLIS et al., 1992). Esses resíduos são os resíduos nucleófilo da serina, resíduos de sítios ácidos (aspartato ou glutamato) e resíduos de histidina. Sendo importante ressaltar que esses resíduos ocorrem sempre nessa ordem de sequência de aminoácidos e é crucial para todas as reações catalisadas como serino hidrolases (JAEGER et al., 1998; REETZ, 2002).

Como mecanismo de ação, a lipase hidrolisa a ligação éster presente em acilglicerois, liberando o ácido graxo e glicerol. A hidrólise do substrato ocorre em quatro etapas, como descritos por Jaeger (JAEGER et al, 1998). Na primeira etapa ocorre um ataque do par de elétrons do átomo oxigênio (do grupo hidroxila do resíduo nucleofílico da serina) presente no carbono da carbonila que forma a ligação éster do substrato. A nucleofilicidade apresentada pelo átomo de oxigênio do grupo hidroxila da serina é aumentada pela presença do aminoácido histidina, pois o próton do grupo hidroxila da serina é transferido para a histidina, que possui um anel imidazol que estabiliza a carga formada. Na segunda etapa ocorre a formação de uma estrutura tetraédrica transitória, a qual é caracterizada pela carga negativa do átomo de oxigênio da carbonila, que por sua vez é estabilizado pela interação de ligações de hidrogênio de dois peptídeos através dos grupos NH. Na terceira etapa o próton do grupo imidazol da histidina forma ligação com o oxigênio do éster presente no tetraedro intermediário que por sua vez sofre clivagem, liberando um álcool. A molécula de água presente no meio reacionário é ativada pelo aminoácido histidina que libera o grupo OH, no qual ataca o carbono da carboxila do grupo acil ligado ao aminoácido serina. Na última etapa a histidina doa um próton do grupo imidazol para o átomo de oxigênio da serina, que libera o grupo acil do ácido carboxílico formado. Após a difusão do ácido carboxílico, inicia-se novamente o ciclo catalítico.

Estas enzimas foram dimensionadas para operar na interface (lipídeo/aquoso) de um sistema bifásico, onde o substrato característico pode ser uma camada monomolecular, micelas ou ainda um aglomerado de moléculas de éster com uma interface no meio aquoso (AVELAR et al., 2013).

As lipases possuem uma interface lipídeo/aquoso, fenômeno este, que ocorre por características estruturais específicas pertencentes a este grupo de enzimas (JAEGER et al., 1998). A teoria atualmente aceita para este fenômeno diz que uma parte da superfície da enzima se encontra em melhor equilíbrio termodinâmico quando inserida interface lipídeo/aquoso e que esta conformação coloca o sítio ativo da enzima em posição favorável para a catálise (BOURGSTON; BROCKMAN, 1984). Este fenômeno é comumente denominado de ativação interfacial (REETZ, 2002).

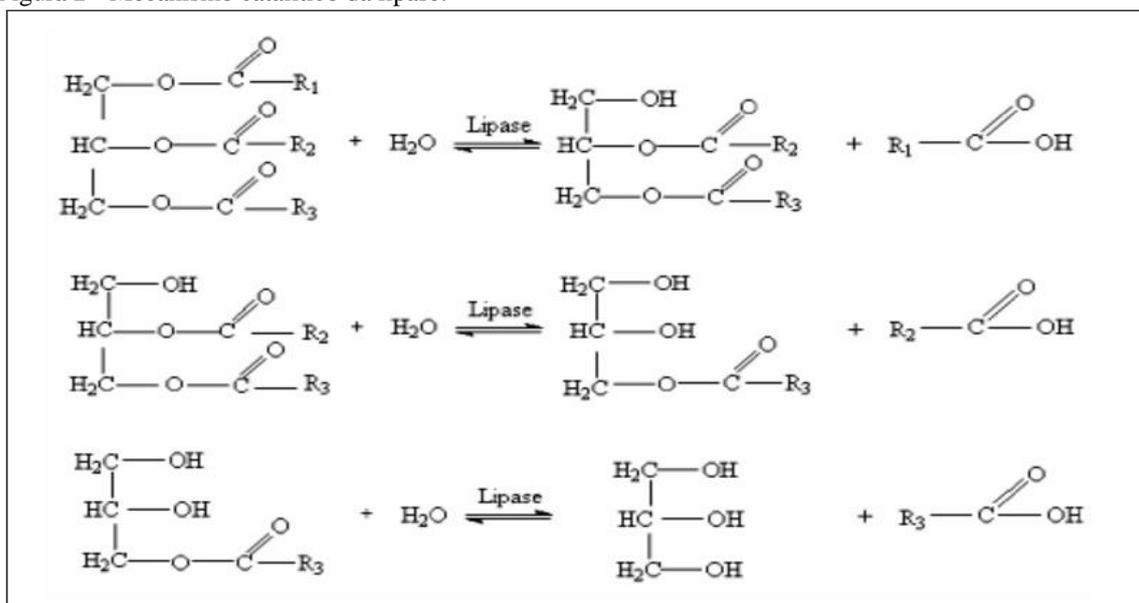
As lipases possuem um oligopeptídeo helicóide que protege o sítio ativo. Ao interagir com uma superfície hidrofóbica, o seu sítio ativo se torna acessível e, portanto, ativo permitindo assim livre acesso ao substrato (MENDES et al., 2013). Estudos demonstram que na ausência dessa interface lipídeo/água o sítio ativo da lipase se torna obstruído. A obstrução do sítio ativo ocorre pela formação de cadeia de aminoácidos na forma de hélice (SCHRAG et al., 1997).

As lipases são difíceis de diferenciar das estearases. Sarda e Desnuelle (1958) propuseram definir lipases a partir da sua característica cinética, propriedade de ativação na presença de substrato pouco solúveis em água e emulsionados, ou seja, quando na presença de substrato pouco solúveis em água e emulsionados, na presença de uma interface lipídeo/água, pois assim, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto que as estearases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica somente sobre substratos solúveis em água.

Um fator determinante para a caracterização das lipases está condicionado a presença da “tampa” na estrutura da enzima e na propriedade de ativação interfacial. O sítio ativo destas enzimas apresenta recoberto por uma tampa hidrofóbica, que ao interagir com a interface lipídeo/água, sofreria uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo (WINKLER et al., 1990).

A figura 2 na próxima página exhibe hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo catalisada por lipase.

Figura 2 - Mecanismo catalítico da lipase.



Fonte: Adaptado de (Mendes et al., 2005).

2.2.3 Protease

As proteases, também conhecidas como enzimas proteolíticas, são constituintes essenciais em todas as formas de vida, incluindo os procaríotos, os fungos, as plantas e os animais (KUMAR; TAKAGI, 1999). As enzimas proteases estão envolvidas em processos biológicos essenciais, tais como a coagulação sanguínea, morte celular, diferenciação de tecidos, catabolismo de proteínas, processamento e transporte de proteínas secretoras através da membrana (MAURER, 2004).

As proteases são classificadas em dois grupos principais, que são as exopeptidases (EC 3.4.11-19) e endopeptidases (EC 3.4.21-99), dependendo do sítio de ação dessas enzimas (RAO et al., 1998). As exopeptidases iniciam o processo de degradação a partir das extremidades amino (N) ou carboxi-terminal (C) das proteínas, produzindo pequenos peptídeos ou mesmo aminoácidos. As exopeptidases podem ser subdivididas em aminopeptidases (quando clivam as ligações peptídicas próximas ao grupamento amino terminal) ou carboxipeptidases (quando clivam as ligações peptídicas próximas ao grupamento carboxílico terminal). Baseado no tipo do grupo funcional presente no sítio catalítico da enzima, as carboxipeptidases foram subdivididas em serina, metalo, e cisteína carboxipeptidases (RAO et al., 1998). As endopeptidases são também chamadas proteinases, sendo, portanto, muito comum a utilização do termo proteinase para se referir a uma protease. As endopeptidases clivam a proteína alvo

na sua parte interna, longe das extremidades amino e carboxi-terminal, gerando dessa forma peptídeos maiores. As endopeptidases são ainda classificadas em quatro relevantes grupos: serina, cisteína, aspártico e metaloproteases. As serina-peptidases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo, aspártico-peptidases têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico, cisteína-proteases apresentam um aminoácido cisteína e as metaloproteases usam um íon metal (cálcio) no seu mecanismo catalítico (RAO et al.,1998).

2.3 ESTUDOS DE ESTABILIDADE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Entende-se por estabilidade a capacidade de uma formulação de manter as especificações químicas, físicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas. A monitorização da estabilidade de medicamentos é um dos métodos mais eficazes para avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados à qualidade do produto durante seu tempo de validade. Também a segurança e a eficácia podem ser avaliadas por estudos de estabilidade, pelo monitoramento da formação de produtos de degradação, que podem gerar perda de atividade ou até mesmo toxicidade (CARVALHO et al., 2005).

Os estudos de estabilidade devem ser realizados durante a etapa de desenvolvimento para que se possa prever e evitar possíveis problemas na formulação (OLIVA; LABRÉS; FARIÑA, 2011). Entende-se como formulação farmacêutica, a combinação de um princípio ativo (podendo ser um ou mais) com excipientes farmacêuticos. Estes últimos também conhecidos como adjuvantes farmacêuticos, os quais não possuem atividade farmacológica, apenas auxiliam na formulação farmacêutica, atuando como estabilizantes, conservantes, diluentes, entre outras funções (ANSEL et al., 2011).

A definição de estabilidade se refere a extensão em que um produto retém, dentro dos limites especificados e dentro do período de armazenagem e de uso, as mesmas propriedades e características que possuía na ocasião em que foi fabricado e ela pode ser estudada sob cinco aspectos: químico, físico, microbiológico, terapêutico e toxicológico que são discutidos nas diretrizes da (ICH), na categoria Diretrizes de Qualidade (Quality Guidelines) (ICH, 2015).

Ao se desenvolver uma nova formulação farmacêutica, é necessário que seja feita a caracterização adequada tanto do princípio ativo quanto dos excipientes a serem utilizados. Essa caracterização abrange a utilização de uma série de métodos analíticos para determinar suas propriedades físicas e químicas. É importante observar que as características do princípio ativo

podem se alterar na presença de determinados excipientes, o que deve ser considerado durante os testes de estabilidade.

Os estudos de estabilidade são descritos pelo ICH que elaborou guias com orientações sobre a qualidade de produtos biológicos e biotecnológicos. O guia Q5C trata especificamente sobre testes de estabilidade desses produtos e o guia Q6B refere-se sobre especificações que devem ser atendidas bem como os testes e critérios de aceitação exigidos (ICH, 2015). O cumprimento dessas orientações é imprescindível para a obtenção de produtos de alta qualidade, segurança e eficácia, além de dar credibilidade ao produto no âmbito internacional (RACAITYTE, et al. 2005).

Segundo a legislação, RE n° 01/05 da ANVISA, os tipos de estudos de estabilidade são:

- a) O estudo de estabilidade de acompanhamento, estudo realizado para verificar se o produto farmacêutico mantém suas características físicas, biológicas, químicas e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração.
- b) O estudo de estabilidade de longa duração, estudo realizado para a verificação das características físicas, biológicas, químicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e após do prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento.
- c) O estudo de atividade acelerado, consta do estudo realizado para acelerar a degradação química e/ou física de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Com os dados obtidos, neste estudo, juntamente com aqueles dos estudos de longa duração, os resultados podem ser usados para avaliar o efeito de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto.

As câmaras climáticas, que são utilizadas para realizar os experimentos com relação à temperatura e umidade necessárias aos estudos de estabilidade de acordo com o que é previsto na legislação para cada tipo de forma farmacêutica, devem ser devidamente preparadas, de modo a garantir a confiança dos resultados e evitar possíveis falhas (BARRON, 2003).

Na literatura, estas enzimas são citadas na maioria das vezes de forma isolada. No trabalho realizado por Pereira et al., (2010) pesquisou-se a inibição de enzimas digestivas por extratos de pó comercial de *Hoodia gordonii* utilizado no tratamento da obesidade. Com os resultados obtidos foi possível evidenciar que os extratos de pó de *Hoodia gordonii* analisados não são capazes de inibir estas enzimas em níveis considerados satisfatórios.

Moraes et al., (2009) pesquisou o perfil enzimático α -amilase, lipase e tripsina do pâncreas e o crescimento do fígado, intestino e pâncreas de frangos de corte na fase de 1 a 21 dias de idade. Para determinação das atividades o autor relata que utilizou Kit específico. Com os resultados foi possível concluir que o crescimento máximo relativo ao pâncreas coincide com a maior atividade de amilase e lipase. A tripsina (protease) tendeu a ser constante pelo fato de os animais terem sido alimentados com dietas purificadas e, portanto, não ter havido estímulo para produção de enzimas proteolíticas.

Freitas et al., (2014) pesquisou a produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. Com os resultados obtidos, foi possível avaliar como a atividade e a estabilidade variam em uma ampla faixa de pH e temperatura, sendo o pH ideal entre 4,0 e 6,0, com relação à temperatura, a amilase de *S. racemosum* mostrou ser termofílica, uma vez que apresentou maior atividade na faixa de temperatura de 60°C e 70°C. Estes resultados também são interessantes do ponto de vista do potencial de aplicação da enzima, especialmente em processos que requerem altas temperaturas, em torno de 70°C.

Miau e colaboradores avaliaram os efeitos inibitórios do extrato de chá verde sobre a atividade α -amilase pancreática humano e seu mecanismo molecular. O extrato de chá verde composta de epicatequina (59,2%), epigallocatequina galato (14,6%) e epicatequina galato (26,2%). A determinação da atividade enzima mostrou que a % de inibição da α -amilase no chá verde (10%, baseado em amido) foram de 63,5% e 2,07 mg / ml, respectivamente, o que indica que o extrato de chá verde, é um inibidor eficaz da α -amilase. Assim, o extrato de chá verde pode ser utilizado para manipular a digestão do amido para os benefícios potenciais para a saúde (MIAU et al., 2015).

Dhital e colaboradores relataram na inibição da atividade de α -amilase por celulose com base nos experimentos in vitro. Mostraram que, em análises cinéticas de hidrólise de amido de milho pela enzima α -amilase na presença de celulose, ocorre inibição da atividade enzimática. A inibição observada da atividade de α -amilase sugere que a celulose na dieta pode potencialmente atenuar a hidrólise do amido (DHITAL et al., 2015).

2.4 EXCIPIENTES

O termo excipiente designa agentes, diferente do fármaco ou pró-fármaco que tem sua segurança avaliada e funções específicas que possibilitam a obtenção de formas farmacêuticas

estáveis, atraentes, eficazes e seguras. Os excipientes possuem intenções variadas, tais como, auxiliar na preparação, fornecer estabilidade física, química e microbiológica ao produto, melhorar a disponibilidade do princípio ativo no organismo, garantir a aceitabilidade do paciente e manter a efetividade do produto durante a estocagem e uso (FERREIRA; VILLANOVA, 2006, VILLANOVA; SÁ, 2009).

O tradicional conceito de excipiente vem sofrendo grande evolução. Sabe-se atualmente que o comportamento da forma farmacêutica é dependente de variáveis do processo produtivo, da interação entre os excipientes, e do impacto dos mesmos sobre o princípio ativo e a forma farmacêutica. Excipientes, anteriormente vistos como simples substâncias facilitadoras da administração e estabilizadoras da preparação, são considerados, hoje, constituintes essenciais que garantem o desempenho, a segurança do medicamento e a obtenção do efeito terapêutico, devendo ser, portanto, objetos de importantes considerações durante a fase de pré-formulação (VILLANOVA; SÁ, 2009).

Muitos problemas com excipientes podem ser prevenidos com o conhecimento adequado da formulação (GOLIGHTLY et al., 1988). Os conhecimentos na área biofarmacêutica, a introdução dos biopolímeros no mercado e a disponibilidade de tecnologias de produção e métodos analíticos sofisticados, capacitaram farmacêuticos pesquisadores a desenvolver formas farmacêuticas cada vez mais específicas (como as de liberação modificada), com maior seletividade na liberação do princípio ativo e, conseqüentemente, com eficácia terapêutica aumentada. A segurança dos excipientes para utilização em medicamentos está relacionada com as interações físicas e químicas e toxicidade dos mesmos (VILLANOVA; SÁ, 2009).

Apesar de possuir baixa reatividade, os excipientes podem iniciar, propagar ou participar de interações físicas ou reações químicas que podem levar à desestabilização da forma farmacêutica ou degradação do fármaco. Essas podem acontecer entre os excipientes e o fármaco, ou entre os demais excipientes da formulação, causando redução da qualidade e perda da eficácia do medicamento (VILLANOVA; SÁ, 2009).

Pode ser destacada a presença de grupos funcionais alcoólicos, grupos terpênicos em flavorizantes, corantes contendo iodo, espécies complexantes (EDTA) ou substâncias redutoras (lactose) como possíveis desencadeadores de reações. Inúmeros excipientes possuem centros quirais (amido e celulose) que podem interagir com fármacos racêmicos. A presença de grupos funcionais nos excipientes, como carboxilas, sulfitos, aminas, álcoois, ésteres e fenóis são sítios comuns para indução de oxidação por transferência de elétrons. A presença de peróxidos em excipientes é uma das principais fontes de oxidação em formulações farmacêuticas

(WATERMAN et al., 2002) e pode ser significativa em excipientes como a hidroxipropilcelulose, polissorbatos, polietilenoglicóis, polivinilpirrolidona e nos polímeros em geral (FERREIRA; VILLANOVA, 2006, WHASYLASCHUK et al., 2007).

Segundo Ferreira e Villanova (2006), a qualidade dos medicamentos depende não só dos princípios ativos e dos processos empregados, mas também do desempenho dos excipientes. A escolha do excipiente adequado para determinada formulação, deve se basear nas características dos princípios ativos contidas nas formas farmacêuticas, bem como, na possibilidade de interação destas substâncias com os excipientes. Os excipientes exercem influência na biodisponibilidade dos fármacos incorporados em formas farmacêuticas orais sólidas. O tipo e a natureza dos excipientes utilizados na preparação de sólidos orais são dois dos fatores que determinam a velocidade e a extensão na qual o fármaco vai ser absorvido, uma vez que limitam a liberação e conseqüentemente dissolução do princípio ativo. (VILLANOVA; SÁ, 2009).

Há um grande interesse na “harmonização” internacional dos padrões aplicados aos excipientes. Isso se deve ao fato da indústria farmacêutica ser multifuncional, visto que as grandes companhias estão instaladas em vários países e seus produtos são vendidos em todo o mundo e, em geral, a aprovação desses produtos precisa ser feita em cada um dos países (ANSEL et al., 2000).

2.5 ESPECTROFOTOMETRIA UV/Vis EM ESTUDOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A espectrofotometria UV/Vis é a técnica analítica mais empregada nos laboratórios de rotina em função da robustez, custo relativamente baixo das análises, da facilidade de operação, da sensibilidade atingida e grande número de aplicações desenvolvidas (ROCHA; TEIXEIRA, 2004). Esta técnica analítica apresenta características importantes que incluem: ampla aplicabilidade (espécies orgânicas e inorgânicas absorvem radiação na região UV/Vis), alta sensibilidade (detecção na faixa de 10^{-4} a 10^{-7} mol/L), seletividade adequada ao comprimento de onda e boa exatidão (SKOOG et al., 2002). A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, conhecida também como lei de Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação de amostras nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. A lei de Beer representa quantitativamente como a grandeza da atenuação do feixe que depende da concentração das moléculas absorventes e da extensão do caminho sobre

o qual ocorre a absorção. Para uma solução do analito de determinada concentração, quanto mais longo for o comprimento do caminho óptico, mais centros absorventes estarão disponíveis para absorver a radiação e, conseqüentemente, maior será a atenuação. Também, para um dado caminho óptico, quanto maior for a concentração de absorventes, maior será a atenuação do sinal analítico transmitido ou maior será a absorbância (SKOOG et al., 2006). Para a determinação espectrofotométrica de espécies na região UV/Vis, normalmente é necessário o uso de reagentes para a conversão da espécie de interesse em uma forma que permita a medida da absorção de radiação com maior sensibilidade. Portanto, espécies que absorvem fracamente podem ser convertidas em compostos com maior absorvidade, visando a determinação de menores quantidades do analito (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

Diferentes métodos de medição catalítica foram desenvolvidos e, embora novos métodos analíticos foram publicados, os métodos tradicionais são efetivos e ainda em uso. Vários métodos têm sido descritos para a detecção e determinação de atividades enzimática, entre eles método mais simples e mais acessível usa reações colorimétricos, que são detectadas e quantificadas por espectrofotometria. A principal vantagem da espectroscopia é que ela pode ser quantitativa, com baixo custo de operação e fácil de usar (LOPES et al., 2013).

Todas as amostras deste trabalho foram analisadas empregando-se espectrofotometria UV/Vis, que é uma técnica recomendada pelo ICH para avaliação de estabilidade de biofármacos.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito estabilizante dos excipientes comumente utilizados nas formulações contendo pancreatina.

Os objetivos específicos foram:

- a) Submeter amostras de misturas binárias 1:1 (m/m) do biofármaco com cada excipiente às condições de armazenamento recomendadas pelo ICH para estudo de estabilidade acelerada específica para biofármacos ($40 \pm 1^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de umidade relativa e a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ na ausência de umidade) e seus efeitos sobre a atividade catalítica das enzimas;
- b) Avaliar a estabilidade da pancreatina na presença de diferentes excipientes por espectrofotometria UV/Vis nas amostras submetidas às condições de armazenamento;
- c) Estudar as alterações relativas a atividade enzimática de medicamento comercial contendo pancreatina sob influência das mesmas condições de armazenamento descritas anteriormente;
- d) Realizar testes de estresse (alta temperatura, pH ácido, pH básico, luz ultravioleta e oxidação forçada) e estabelecer os seus efeitos na atividade catalítica das três enzimas que compõe a pancreatina.

4 METODOLOGIA

A quantificação de uma determinada enzima presente em um meio é trabalhosa, pois parte da enzima pode estar inativa ou parcialmente ativa, além da possibilidade da existência de outras enzimas no mesmo meio. Este trabalho teve como alvo de pesquisa a pancreatina, que se destaca entre as enzimas por se tratar de um complexo enzimático.

A metodologia empregada nas determinações da atividade enzimática por espectrofotometria da α -amilase, lipase e protease presentes na pancreatina seguiu procedimentos descritos na literatura com modificações no volume de cada solução, afim do volume final da reação preencher adequadamente uma cubeta de 1cm² de caminho óptico.

Foram realizados vários testes até poder encontrar um método que fosse eficaz na determinação da atividade enzimática em formulações farmacêuticas. Adicionalmente, relata-se que é escasso o número de publicações envolvendo análise enzimática aplicada a formulações farmacêuticas contendo o princípio ativo pancreatina. A maioria dos trabalhos disponíveis estão relacionados a determinação de atividade destas enzimas em amostras, principalmente de alimentos.

A determinação da atividade enzimática α -amilase e da protease foi baseada na metodologia descrita pela ANVISA (2012), a qual determina a atividade destas enzimas presentes em detergente. Russell (2007) também empregou esta metodologia com algumas modificações para determinação de atividade da α -amilase presentes em grãos de cereais.

A metodologia de determinação da atividade enzimática da lipase usada foi baseada nos métodos descritos por Kanwar (2005) e Mohamed (2013) que realizaram as análises de inibição da atividade enzimática em *Bacillus coagulans* e *Candida antarctica*.

Para o estudo de estabilidade envolvendo a pancreatina foram utilizados os excipientes manitol, celulose microcristalina e talco por serem comuns em formulações farmacêuticas, o ácido cítrico também foi testado, pois pode melhorar a estabilidade do pó seco, sendo amplamente utilizado em formulações de insulina. A sacarose foi avaliada por ser um ligante seco que induz a um aumento na estabilidade. A sacarose encontra-se presente em formulações contendo proteínas. Ela absorve até 1% de umidade. O estearato de magnésio por sua vez foi selecionado por ser hidrofóbico e pode retardar a dissolução de um fármaco a partir de uma forma de dosagem sólida. Os excipientes utilizados neste trabalho possuíam 99% de grau de pureza e foram fornecidos pela Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. (talco, lote:

0904001015; manitol, lote: 113154; celulose microcristalina, lote: 1111000180; ácido cítrico, lote: 171009; estearato de magnésio, lote: 110400529 e sacarose, lote: 113157).

No desenvolvimento deste trabalho foi utilizado padrão de pancreatina produzido pela Sigma-Aldrich, Cod. P1625, lote #SLBF6091V, cuja atividade é de 3 x USP. Foi realizado ainda stress testing em 5 condições. Todas as amostras foram analisadas para avaliar o efeito na atividade da α -amilase, lipase e protease empregando-se espectrofotometria UV/Vis.

Neste trabalho, também foi avaliada a atividade enzimática da α -amilase, lipase e protease presente no biofármaco Creon 10.000 produzido pelo Laboratório Solvay, lote: 1004749.

4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

A metodologia utilizada para o preparo das amostras como padrão de pancreatina, misturas binárias e amostra comercial são apresentadas a seguir.

4.1.1 Padrão de pancreatina e misturas binárias

Para análise das influências dos excipientes e condições de armazenamento na estabilidade das enzimas foram avaliadas amostras de padrão de pancreatina pura e das misturas binárias de padrão de pancreatina com cada excipiente na proporção de 1:1 (m/m). Para isso, amostras do padrão de pancreatina foram armazenadas em câmara de estabilidade durante o período de um, três e seis meses sob duas condições: 1) $40 \pm 1^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de umidade relativa, em recipientes de acrílico sem tampa; e 2) $40 \pm 1^\circ\text{C}$ sem umidade denominada condição a seco. Neste último caso, os recipientes de acrílico foram tampados e vedados com película Parafilm®. Estas condições de armazenamento foram selecionadas de acordo com as normas descritas pelo ICH (2012). Após o tempo de armazenamento, a quantidade total armazenada, ou seja, 60 mg de cada amostra em mistura binária (30 mg de padrão de pancreatina com 30 mg de cada excipiente) e 30 mg de cada amostra pura (contendo somente o padrão de pancreatina), foram solubilizados em 25 mL de tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 7,0, como solução estoque, apresentando uma concentração de 90 U/mL de α -amilase, 7,2 U/mL de lipase e 90 U/mL de

protease e, valores determinados segundo a especificação do padrão pancreatina (Sigma-Aldrich) onde 1 mg de pancreatina (3 x USP) utilizada neste trabalho apresenta 75 U de amilase, 6 U de lipase e 75 U de protease, sendo U, uma unidade ativa de enzima.

Para o teste de atividade de α -amilase a diluição foi realizada utilizando tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 7,0 a fim de obter soluções de concentração igual a 2,0 U/mL de α -amilase. Para o teste de atividade de lipase foi utilizada solução de Tris/HCl, 50 mM, pH 9,0, a fim de obter soluções de concentração igual a 6 U/mL de lipase. Para o teste de atividade de protease a diluição foi realizada utilizando tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 7,5 a fim de obter solução de concentração igual a 14 U/mL de protease. Estas concentrações foram determinadas segundo testes e adaptações das metodologias utilizadas como referência neste trabalho a fim de obter a concentração do ponto médio de cada curva analítica utilizada na análise espectrofotométrica.

4.1.2 Amostra comercial de medicamento contendo pancreatina

O biofármaco Creon é comercializado nas apresentações, Creon10.000, cartela com 30 e 100 cápsulas com microesferas com revestimento ácido-resistente e Creon 25.000, cartela com 30 cápsulas também na forma de microesferas com revestimento ácido-resistente. Estes medicamentos apresentam prazo de validade de dois anos e devem ser conservados em temperatura ambiente (entre 15 e 30°C).

Neste trabalho foi utilizado o Creon 10.000 que possui em sua formulação 10.000 unidades de lipase, principal constituinte desse biofármaco, 33.200 unidades de α -amilase e 37.500 unidades de protease por cápsula. Possui ainda em sua formulação os excipientes: macrogol, ftalato de hipromelose, álcool cetílico, citrato de trietila, dimeticona, gelatina, óxido de ferro anidro III, óxido de ferro II, óxido de ferro III, dióxido de titânio e laurilsulfato de sódio. Dentre os medicamentos que possuem pancreatina em sua formulação, apenas o Creon está sendo comercializado, os demais foram retirados do mercado.

Amostras do biofármaco Creon 10.000 (tanto as cápsulas íntegras quanto o conteúdo interno das cápsulas, denominado neste trabalho como pó) foram submetidas ao estudo de estabilidade empregando as mesmas condições de armazenagem e metodologia aplicada nos testes de atividade enzimática do padrão de pancreatina puro e das misturas binárias. Para a obtenção do pó do medicamento, as cápsulas foram abertas e o seu conteúdo transferido para

um gral, em seguida o mesmo foi triturado e homogeneizado, fazendo uso de um pistilo. Após trituração e homogeneização, foi realizada a pesagem de 30 mg de cada amostra que foi solubilizado em 25 mL de tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 7,0, como solução estoque. O teor esperado desta solução estoque foi de aproximadamente 153,0 U/mL de α -amilase, 46,0 U/mL de lipase e 173,0 U/mL de protease. Desta solução estoque foram realizadas três novas diluições usando tampões específicos (os mesmos descritos anteriormente) a fim de obter uma solução contendo 2,0 U/mL de α -amilase, outra solução contendo 6,0 U/mL de lipase e uma terceira solução contendo 14,0 U/mL de protease. É importante frisar que a massa média em cada cápsula deste medicamento continha 258 ± 10 mg.

4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

A seguir estão descritos todos os materiais, equipamentos e metodologia empregados neste trabalho.

- a) Balança analítica, modelo AY220, marca SHIMADZU utilizada durante o preparo das amostras e soluções;
- b) Agitador de tubos tipo vórtex, modelo MIXER:S0200, marca LABNET utilizado para homogeneizar as misturas binárias;
- c) Câmara de estabilidade, modelo N1040, marca NOVUS usado para incubação das amostras à 40°C e 75% de umidade relativa e sem umidade relativa;
- d) Espectrofotômetro UV/Vis, marca Evolução 60, marca THERMO SCIENTIFIC, empregando cubetas de acrílico de 1 cm de caminho ótico usado para a determinação da atividade catalítica;
- e) Agitador magnético, modelo MA 085, marca MARCONI;
- f) pHmetro, modelo mPA201, marca MS TECNOPON;
- g) Micropipetas de volumes variáveis, marca SELECT BIOPRODUCTS;
- h) Frascos polietileno para acondicionamento das amostras;
- i) Vidrarias de uso comum.

4.3 REAGENTES E SOLUÇÕES

A seguir são apresentados os reagentes e soluções utilizados neste trabalho.

- a) Tampão Tris/HCl, 50 mM, em pH 6,6; 7,0; 7,5 e 9,0;
- b) Tampão Acetato, 50 mM, pH 6,6;
- c) Solução de ácido tricloacético (TCA) a 20% (v/v)
- d) Padrão de glicose a 55,6 $\mu\text{mol/mL}$;
- e) Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a 0,74% (m/v);
- f) Solução de amido solúvel a 1% (m/v)
- g) Azocaseína a 2% (m/v);
- h) Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,05% (m/v);
- i) HCl 1 M;
- j) Palmitato de p-nitrofenila (pNPP) a 20 mM;
- k) Tampão de ácido cítrico 100 mM, em pH 3;
- l) Tampão de Tri/HCl 100 mM, em pH9;
- m) Tampão carbonato/bicarbonato 50 mM, em pH 11;
- n) Tampão Tris/HCl 50mM em pH 7

O preparo dos reagentes e das soluções utilizados neste trabalho está descrito a seguir:

- a) A solução de amido, utilizada como substrato na determinação espectrofotométrica de α -amilase, foi preparada na concentração de 1% (m/v) da seguinte forma: 1 g de amido foi dissolvido em água destilada, aquecida até a fervura e, após ser resfriado o volume foi aferido para 100 mL;
- b) No preparo da solução padrão de glicose 55,6 $\mu\text{mol/mL}$ ou 1% (m/v) 1 g de glicose foi dissolvido em 100 mL de água destilada;
- c) Para o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) a 0,74% (m/v), 3,0 g de hidróxido de sódio foram solubilizados em aproximadamente 500 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 51 g de tartarato de sódio e potássio; 1,38 g de metabissulfito de sódio; 0,63 g de fenol e 1,77 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico;
- d) No preparo da solução-tampão Tris/HCl, 50 mM dissolveu-se 0,605 g de Tris em 90 mL de água destilada, em seguida, foi adicionada solução de HCl 1 M na quantidade suficiente para ajustar o pH. O volume foi completado para 100 mL.

- e) Para o preparo do substrato, solução de pNPP 20 mM, empregada na determinação espectrofotométrica de lipase foi dissolvido de 0,75g pNPP em 100 mL de isopropanol. Esta solução deve ser preparada no dia da análise.
- f) No preparo da solução de SDS 0,05% (m/v) foi dissolvido 50 mg de SDS em 100 mL de água destilada.
- g) A solução de azocaseína a 2% (m/v), substrato utilizada na determinação espectrofotométrica de protease, foi feita dissolvendo 2 g de azocaseína em 100 mL de água destilada. Esta solução deve ser preparada no dia da análise.
- h) A solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% (m/v) foi feita dissolvendo 20 g de ácido tricloroacético em 100 mL de água destilada, sendo estocada a 4°C por no máximo uma semana.

4.4 TESTE DE ATIVIDADE PARA α -AMILASE

Este método baseia-se na determinação da atividade amilolítica através da quantificação dos açúcares redutores liberados pela reação de hidrólise do amido, catalisada por amilases. Os açúcares redutores foram quantificados por espectrofotometria UV/Vis, comprimento de onda de 550 nm. Como mencionado anteriormente, a determinação da atividade enzimática α -amilase foi baseada na metodologia descrita pela ANVISA (2012) e Russell (2007).

Inicialmente uma curva analítica de glicose foi construída para calcular a atividade catalítica de uma solução de 2,0 U/mL de α -amilase preparada a partir da diluição de uma solução contendo 10 mg do padrão de pancreatina solubilizada em 10 mL de tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 7 (concentração final 75 U/mL de α -amilase). A curva foi feita abrangendo os pontos de 0,065; 0,130; 0,195; 0,261 e 0,326 μ mol/mL de glicose. O valor de absorbância obtido a partir da análise em triplicata da atividade catalítica da solução 2,0 U/mL de α -amilase foi definida como 100% de atividade.

Para a construção da curva analítica foram transferidos 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 μ L de uma solução padrão de glicose a 55,6 μ mol/mL em oito tubos de ensaios. Foram adicionados, respectivamente, em cada tubo de ensaio 600, 580, 560, 540, 520, 500, 480 e 460 μ L de tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 7 e também 1,5 mL de reagente DNS a 0,74% (m/v) em todos os tubos. Paralelamente a isso, em outro tubo de ensaio foram adicionados 300 μ L de

tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 7,0 e 200 μ L de solução de amido solúvel 1% (m/v) e 100 μ L de uma solução de pancreatina 2,0 U/mL. Esta amostra foi incubada em banho-maria a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 minutos. A reação foi interrompida com adição de 1,5 mL de reagente DNS a 0,74% (m/v).

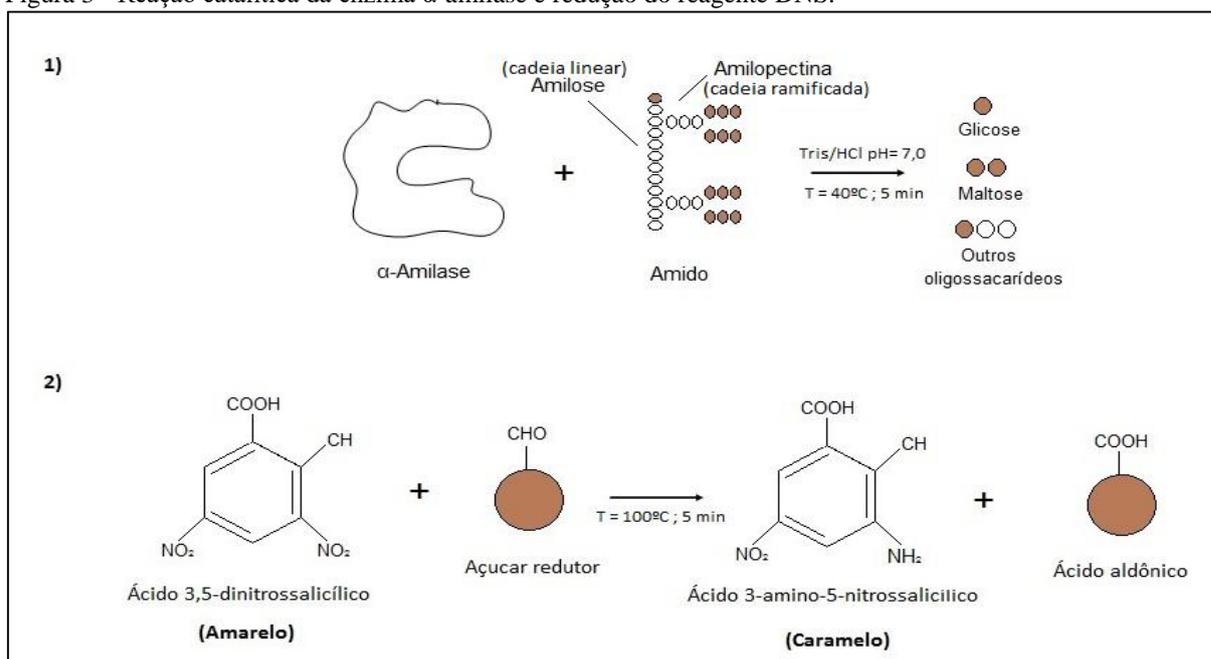
Em seguida, os nove tubos foram colocados em banho-maria a temperatura de 100°C por 5 minutos. Após este período os tubos foram resfriados e seu conteúdo transferido para béqueres contendo 15 mL de água destilada. O conteúdo de cada béquer foi agitado e parte do volume foi transferido para cubetas de acrílico de 1 cm de caminho ótico e analisado por espectrofotometria no comprimento de onda de 550 nm. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

O ensaio das amostras puras, das misturas binárias de pancreatina com diferentes excipientes na proporção de 1:1 m/m e das amostras de medicamento comercial Creon 10.000 submetidas ao estudo de estabilidade acelerada foi realizado utilizando-se de 100 μ L de cada amostra preparada, 300 μ L de tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 7,0 e 200 μ L de solução de amido solúvel 1% (m/v). Os tubos de ensaio também foram incubados em banho-maria a $40 \pm 1^\circ\text{C}$, até atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente 2 minutos). Um branco para cada amostra foi realizado, com adição de amostra e substituindo o volume do substrato por tampão, o qual foi analisado juntamente com a amostra correspondente. Um branco sem adição de amostra também foi feito, substituindo tanto o volume da amostra quanto do substrato por tampão, sendo este branco utilizado para zerar a absorvância do equipamento em 550 nm.

A reação química nesta análise foi interrompida após 5 minutos pela adição de 1,5 mL de reagente DNS a 0,74% (m/v). Depois da interrupção da reação, os tubos foram mantidos sob aquecimento a 100°C por 5 minutos, em seguida, os mesmos foram resfriados e seu conteúdo transferido para béqueres contendo 15 mL água destilada. Este procedimento foi exatamente igual ao adotado na construção da curva de analítica da glicose. Todo este ensaio também foi realizado em triplicata e adotando as mesmas condições espectrofotométricas descritas anteriormente.

A figura 3 apresenta na próxima página representa a reação enzimática da α -amilase com o substrato amido e a redução do reagente DNS.

Figura 3 - Reação catalítica da enzima α -amilase e redução do reagente DNS.



Fonte: Do autor.

4.5 TESTE DE ATIVIDADE PARA LIPASE

Para a metodologia de determinação da atividade enzimática da lipase, foram baseados nos métodos descritos por Kanwar (2005) e Mohamed (2013).

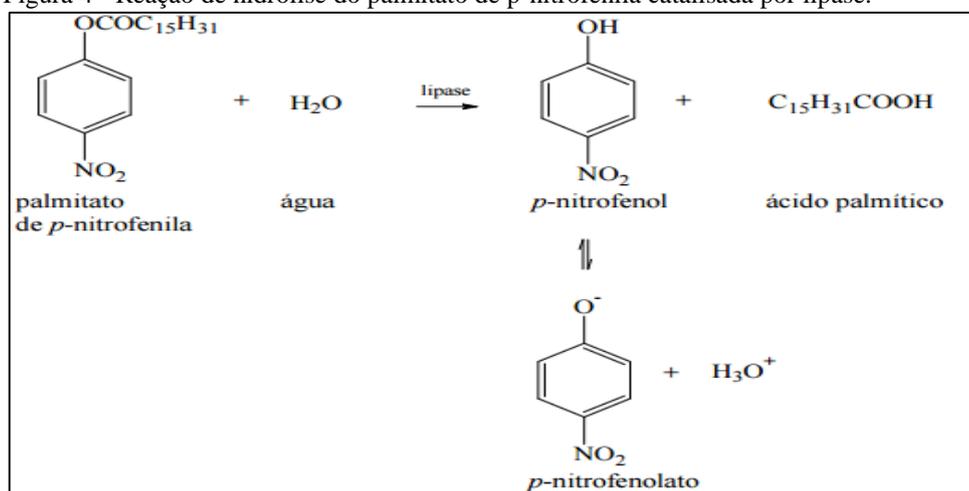
A atividade lipolítica foi determinada pela quantificação do produto formado a partir da hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (pNPP) catalisado por lipases. O produto cromogênio de coloração amarela foi quantificado por espectrofotometria UV/Vis utilizando cubetas de acrílico de 1 cm de caminho ótico e comprimento de onda de 410 nm. Para isso, em tubos de ensaio, foram adicionados 2 mL de tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 9,0 e 75 μL do substrato pNPP a 20 mM. Esta mistura foi colocada em banho-maria a 37°C até atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente 2 minutos). Depois foi adicionado 1 mL de cada amostra pura, das misturas binárias de pancreatina com diferentes excipientes na proporção de 1:1 m/m e das amostras de medicamento comercial Creon 10.000 submetidas ao estudo de estabilidade acelerada. As soluções resultantes foram incubadas novamente em banho-maria por 15 minutos na mesma temperatura descrita anteriormente.

Para a construção da curva analítica foram transferidos 2,0 mL de tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 9,0 para cinco tubos de ensaio. Em seguida, foram adicionados 75 μL de substrato (pNPP a 20 mM) em cada tubo e 1,0 mL de uma solução de padrão pancreatina nas

concentrações de 2, 3, 4, 5 e 6 U/mL de lipase em cada tubo. As soluções de padrão pancreatina foram preparadas pela diluição de uma solução de padrão pancreatina a 6 U/mL em tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 9,0. Estes tubos também foram incubados em banho-maria por 15 minutos a 37°C. Para finalizar a reação foi adicionado 1,0 mL de SDS 0,05% (m/v). Um branco, sem adição de amostra, também foi feito substituindo o volume da amostra por tampão. Esta solução foi utilizada para zerar o equipamento no comprimento de onda do ensaio. O conteúdo de cada tubo foi transferido para cubetas de acrílico de 1 cm e analisado a 410 nm, sendo os ensaios realizados em triplicata.

A figura 4 exhibe a reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila catalisada por lipase, onde ocorre a liberação do *p*-nitrofenolato que apresenta coloração amarela.

Figura 4 - Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila catalisada por lipase.



Fonte: Adaptado de (Baron, 2003).

4.6 TESTE DE ATIVIDADE PARA PROTEASE

A atividade proteolítica foi determinada pela quantificação do grupamento azo liberado pela hidrólise do substrato cromogênico azocaseína, por espectrofotometria no comprimento de onda de 400 nm. A determinação da atividade enzimática da protease foi baseada na metodologia descrita pela ANVISA, a qual determina a atividade destas enzimas presentes em detergente (ANVISA, 2012).

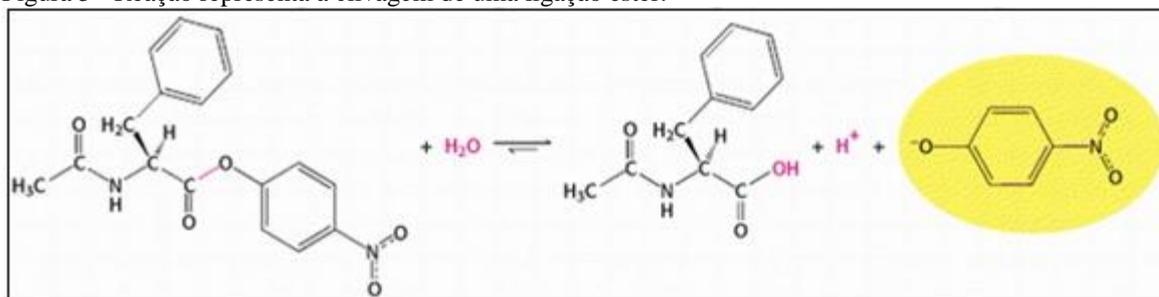
Inicialmente uma curva analítica foi construída para calcular a atividade proteolítica das amostras analisadas. Foram transferidos 400 μL de tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 7,5 para

cinco tubos de ensaio. Em seguida adicionou-se 200 μL de substrato (azocaseína a 2% m/v) em cada tubo e 200 μL de uma solução de padrão de pancreatina nas concentrações de 7,0, 10,5, 14,0, 17,5 e 21 U/mL de protease em cada tubo. As soluções de padrão de pancreatina foram preparadas pela diluição de uma solução estoque de padrão de pancreatina a 75 U/mL em tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 7,5. Estes tubos foram incubados em banho-maria a $40\pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos. A reação foi interrompida com a adição 1,6 mL de TCA 20% (m/v). Em seguida, centrifugou-se os tubos a 6000 rpm por 5 minutos, recolhendo o sobrenadante que foi colocado em cubeta de acrílico de 1 cm e analisado em espectrofotômetro a 400 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

Para o ensaio das amostras puras, das misturas binárias de pancreatina com diferentes excipientes na proporção de 1:1 m/m e das amostras de medicamento comercial Creon 10.000 submetidas ao estudo de estabilidade acelerada, foram adicionados 400 μL de tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 7,5, 200 μL do substrato (azocaseína 2%, m/v) e 200 μL da amostra preparada. As condições da reação química e das análises espectrofotométricas foram as mesmas empregadas para a construção da curva analítica.

A figura 5 representa a reação ocorrida entre o substrato cromogênio, ocorrendo a clivagem de uma ligação éster, com liberação de um produto (amarelo).

Figura 5 - Reação representa a clivagem de uma ligação éster.



Fonte: Do autor.

Nota: Em destaque amarelo a liberação de um produto cromogênio..

É importante frisar que os valores de pH do sistema tamponante e a temperatura de cada ensaio usado para a determinação da atividade das três enzimas foram determinados segundo recomendações do fabricante Sigma-Aldrich, em relação a amostra referência de pancreatina suína (Cod. P1625, lote #SLBF6091V, 3 x USP). A composição do sistema tamponante foi modificado em relação ao utilizado na metodologia de referência a fim de manter a mesma composição do tampão utilizado no ensaio de ambas as enzimas, alterando apenas o valor de pH, para o pH ótimo para a atividade catalítica de cada enzima respectivamente.

4.7 TESTES DE ESTRESSE

Testes de estresse aplicados a biofármacos são conduzidos com diferentes objetivos. Dentre os principais, cita-se: o estabelecimento de seus perfis e mecanismos de degradação, como hidrólise, oxidação, fotólise; a determinação de sua estabilidade intrínseca; a elucidação da estrutura de seus produtos de degradação; a validação de métodos como indicativos de estabilidade; a maior compreensão de suas propriedades químicas; dentre outros (BLESSY, 2013).

Assim, para avaliação da pancreatina e sua estabilidade intrínseca, uma série de *stress testing* (testes de estresse) foi aplicada, conforme recomendado pela *Quality Guidelines*, denominado Q6B, específico para formulação farmacêutica contendo produtos biológicos/biotecnológicos (ICH, 2015). Estes testes foram realizados conforme procedimento previamente descrito por BLESSY et al., 2013 e PRINTZ; FRIESS, 2011.

Nos respectivos testes, a análise da pancreatina foi efetuada em 5 condições distintas, sendo elas, alta temperatura, pH ácido, pH básico, luz ultravioleta e oxidação forçada.

Para cada amostra pesou-se 2,5 mg do padrão de pancreatina (Cód. P1625, lote #SLBF6091V, 3 x USP) em balança analítica, sendo esta posteriormente solubilizada em tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 7,0, a menos quando especificado. Tais soluções de padrão de pancreatina foram preparadas em microtubos de 1,5 mL, sendo seu volume final de 1 mL. Após a solubilização, as soluções passaram por vórtex por 40 segundos, seguidas de 10 minutos em banho de ultrassom. Nas amostras preparadas deste modo esperava-se 187,5 U/mL, 15 U/mL e 187,5 U/mL de α -amilase, lipase e protease, respectivamente.

Para análise da estabilidade térmica, a solução contendo pancreatina a 2,5 mg/mL foi submetida à 70 °C por 60 minutos em banho-maria, sendo posteriormente resfriada a temperatura ambiente, e por fim armazenada sob refrigeração a 4 °C até serem analisadas quanto sua atividade. A escolha da temperatura de estresse baseou-se na temperatura ótima de atividade da pancreatina, dando-se preferência pela temperatura a qual proporcionaria a condição de degradação forçada, no caso, 70 °C (SINGH, 2014).

Para os testes de pH, as amostras de pancreatina foram submetidas a meio ácido usando-se tampão de ácido cítrico, 100 mM, pH 3,0 e a meio básico empregando-se tampão Tris/HCl, 100 mM, pH 9,0 como também tampão $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^{-1}$, 50 mM, pH 11,0. Nestes casos, as massas de pancreatina pesadas foram diluídas utilizando-se os respectivos tampões, e não o tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 7,0 como nos demais testes. Os testes de atividade foram

executados após 60 minutos de exposição. Similarmente a escolha da temperatura de estresse, os pH aplicados tiveram por objetivo proporcionar condições de degradação forçada, e foram selecionados de acordo com o pH de atividade ótima de cada componente da pancreatina descritos previamente.

A solução das enzimas na mesma concentração (2,5 mg/mL) foi ainda submetida à 6W sob luz ultravioleta por 24 horas à temperatura ambiente (25 °C) para os testes de estresse sob intensidade luminosa. Tais amostras foram armazenadas em frasco âmbar e sob refrigeração a 4 °C até a realização das análises. As condições empregadas também baseiam nas especificações referência citadas acima.

Por fim, soluções de pancreatina foram preparadas em tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 7,0 e 3% (v/v) de peróxido de hidrogênio para oxidação forçada.

Essa bateria de testes de estresse foi feita em triplicata e as amostras foram analisadas quanto à atividade enzimática, assim que finalizadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir serão apresentados os resultados e discussões do trabalho realizado nos estudos do efeito estabilizante dos excipientes em pancreatina.

5.1 RESULTADOS OBTIDOS NOS TESTES COM PANCREATINA PURA E MISTURAS BINÁRIAS COM EXCIPIENTES

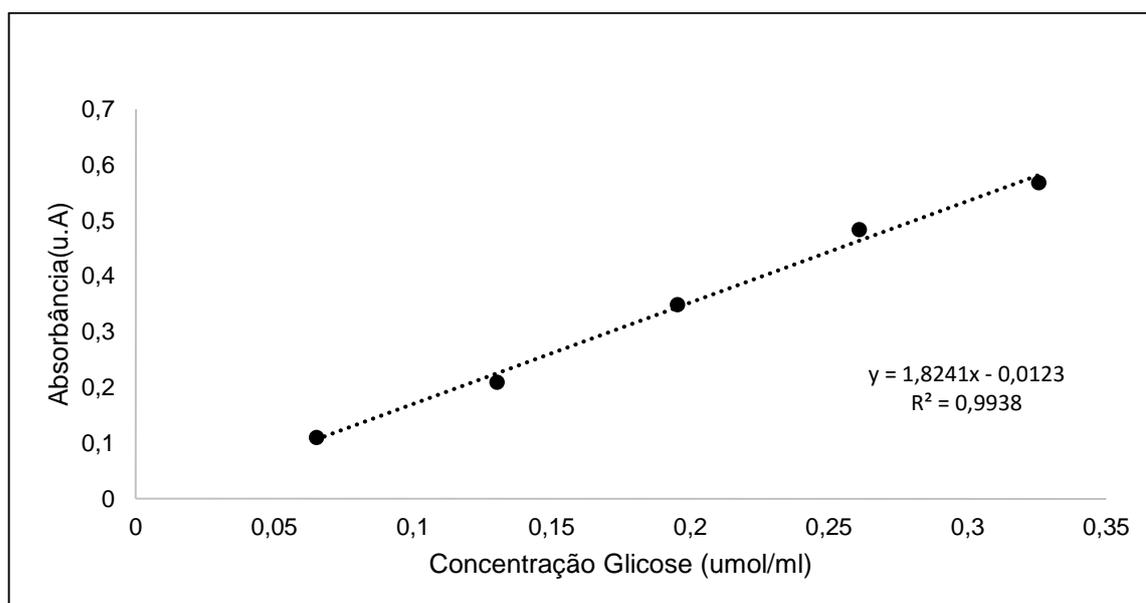
Os próximos itens apresentam as curvas analíticas, limite de detecção e limite de quantificação, bem como a atividade da enzima α -amilase, lipase e protease.

5.1.1 **Curvas analíticas, limite de detecção e limite de quantificação**

O trabalho foi iniciado fazendo a incubação das amostras em câmara de estabilidade de acordo com as condições descritas na seção 4.1.1. Paralelamente, foi iniciado o estudo para avaliar qual seria a melhor metodologia disponível na literatura que pudesse ser reproduzida e padronizada no laboratório de pesquisa aonde o trabalho foi desenvolvido.

A figura 6 exibe a curva de calibração de glicose construída para calcular a atividade catalítica de α -amilase, analisado no espectrofotômetro a 550 nm.

Figura 6 - Curva analítica de glicose usada para análise da atividade de α -amilase.

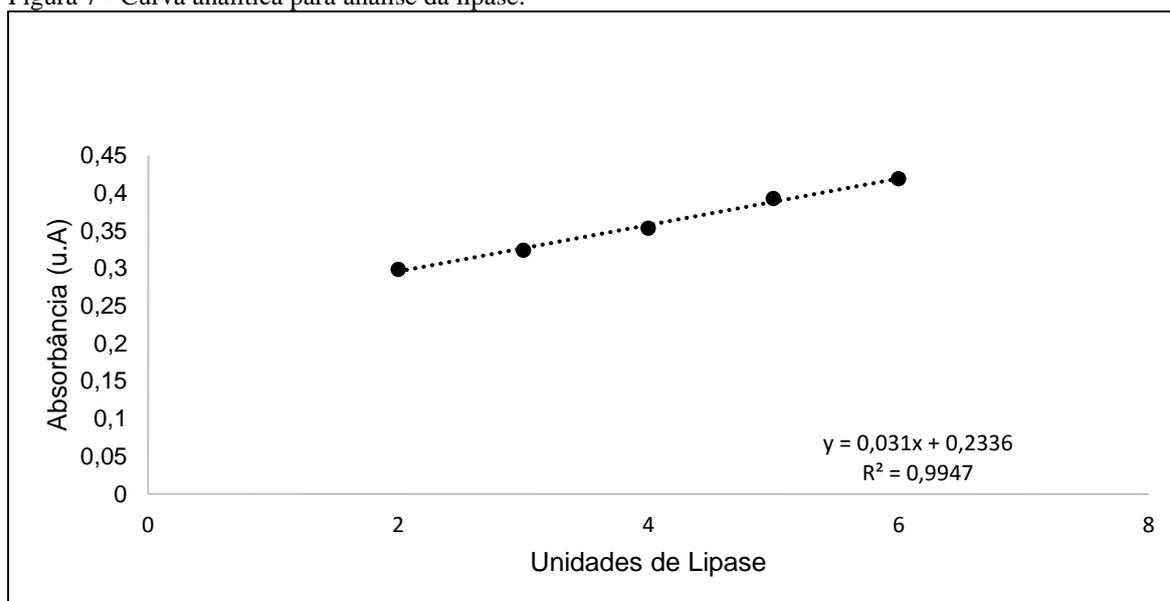


Fonte: Do autor.

Nota: Faixa de concentração de 0,065 a 0,326 $\mu\text{mol/mL}$. Nesta análise a concentração de glicose (0,18 $\mu\text{mol/mL}$) liberada pela solução de 2,0 U/mL de α -amilase, preparada a partir do padrão de pancreatina, foi usada para definir uma atividade de 100% desta enzima. A análise foi feita em espectrofotômetro a 550nm.

A figura 7 exibe a curva de calibração da lipase analisado no espectrofotômetro a 410 nm.

Figura 7 - Curva analítica para análise da lipase.

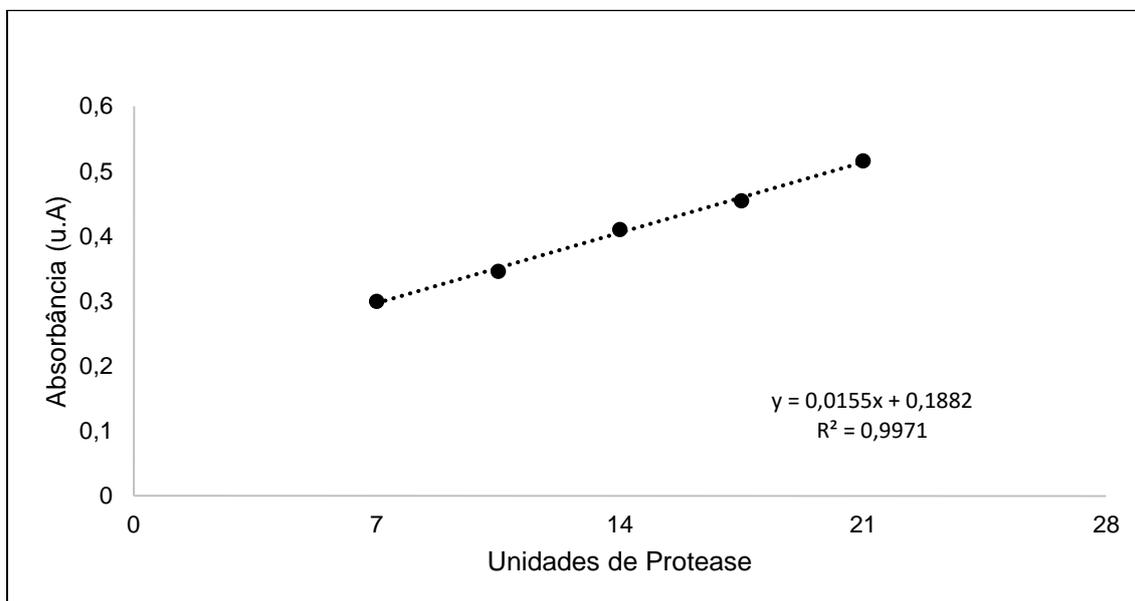


Fonte: Do autor.

Nota: A análise foi feita em espectrofotômetro a 410 nm na faixa de concentração de 2 a 6 U/mL.

A figura 8 exibe a curva de calibração da protease analisado no espectrofotômetro a 400 nm.

Figura 8 - Curva analítica para análise da protease.



Fonte: Do autor.

Nota: Nesta análise foi usada solução de 75 U/mL de protease preparada a partir do padrão de pancreatina. A análise foi feita em espectrofotômetro a 400 nm na faixa de concentração de 7 a 21 U/mL.

Neste trabalho foram avaliados o limite de detecção e o limite de quantificação.

A determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) para cada metodologia empregada foi determinada segundo as seguintes equações:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S}$$

$$LQ = 10 \frac{s}{S}$$

Onde, s é o desvio padrão da análise da resposta (branco) e S é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica. O desvio padrão da resposta da análise de atividade enzimática da α -amilase, lipase e protease foi respectivamente: 0,0007, 0,0005 e 0,0006.

A Tabela 1, na próxima página, exibe o limite de detecção e limite de quantificação da atividade enzimática obtida por meio da análise espectrofotométrica.

Tabela 1 - Limite detecção e limite de quantificação da atividade enzimática.

	α-amilase (U/mL)	Lipase (U/mL)	Protease (U/mL)
LD	0,013	0,060	0,110
LQ	0,044	0,199	0,365

Fonte: Do autor.

Nota: Referente a α -amilase, lípase e protease apenas para avaliação das amostras puras de pancreatina e das misturas binárias submetidas ao teste de estabilidade acelerada.

Após a padronização das metodologias para avaliação da atividade enzimática das três enzimas, com conseqüente obtenção de curvas analíticas adequadas, foram feitas as análises de todas as amostras de pancreatina submetidas ao estudo de estabilidade acelerada nos diferentes tempos de armazenamento.

5.1.2 Atividade da enzima α -amilase

Cada uma das enzimas presentes no complexo da pancreatina apresentou um perfil de degradação diferente entre si. A diferença na condição de armazenamento também foi um fator de grande influência na perda de atividade das enzimas. Este perfil pôde ser acompanhado e determinado em intervalos de tempo (inicial, um, três e seis meses) possibilitando uma análise mais detalhada sobre o comportamento das enzimas durante o armazenamento.

Para a determinação da porcentagem de atividade desta enzima o seguinte cálculo foi realizado. Primeiramente, foi determinada como 100% de atividade a média da absorbância obtida do padrão pancreatina contendo 2,0 U/mL de α -amilase apresentado na figura 6. A concentração de 2,0 U/mL desta enzima gerou uma absorbância média de 0,316 indicando uma liberação de cerca de 0,18 μ mol/mL de glicose.

$$\begin{array}{l}
 0,316 \text{ ----- } 100\% \text{ de atividade enzimática} \\
 \text{Média absorbância da amostra ----- } X\% \text{ atividade enzimática da amostra} \\
 \text{ou} \\
 0,18 \mu\text{mol/mL de glicose ----- } 2,0 \text{ U/mL de atividade enzimática} \\
 \text{Concentração de glicose liberada da amostra --- } X\% \text{ atividade enzimática da amostra}
 \end{array}$$

As tabelas 2 e 3 apresentam os valores obtidos a partir das amostras armazenadas a 40°C e 75% de umidade relativa e 40°C e 0% de umidade relativa, respectivamente.

A enzima α -amilase mostrou um comportamento distinto entre as duas condições de armazenamento. Quando armazenada a 40°C e 75% de umidade relativa, em apenas 1 meses já é possível observar uma queda drástica (maior que de 97,8%) na atividade quando a pancreatina é armazenada na ausência e na presença de todos os excipientes na mistura (1:1, m/m) avaliados, mostrando que a umidade exerce uma forte influência extrínseca sobre a enzima auxiliando a sua degradação. Desta forma, nenhum dos excipientes utilizados conseguiu exercer um efeito protetor sobre a α -amilase nestas condições de armazenamento, provavelmente, o efeito protetor não tenha se manifestado, devido a ionização de grupos ativos presentes (PEREIRA, 2010).

Tabela 2 - Atividade da α -amilase nas amostras de pancreatina armazenadas a 40°C e 75% de umidade relativa.

Amostras	Tempo Inicial			1 mês			3 meses			6 meses		
	Abs. Média	α -amilase (U/mL)	Atividade (%)									
Pancreatina (P)	0,309	1,96	98 \pm 0,9	0,006	\leq LQ	\leq LQ	0,002	\leq LQ	\leq LQ	0	\leq LQ	\leq LQ
P + Ác. Cítrico	0,313	1,98	99 \pm 0,9	0	\leq LQ	\leq LQ	0	\leq LQ	\leq LQ	0	\leq LQ	\leq LQ
P + Sacarose	0,309	1,96	97 \pm 0,9	0	\leq LQ	\leq LQ	0	\leq LQ	\leq LQ	0	\leq LQ	\leq LQ
P + Manitol	0,311	1,97	98 \pm 1	0	\leq LQ	\leq LQ	0	\leq LQ	\leq LQ	0	\leq LQ	\leq LQ
P + Celulose	0,312	1,97	98 \pm 1	0	\leq LQ	\leq LQ	0	\leq LQ	\leq LQ	0	\leq LQ	\leq LQ
P + Estearato de Mg	0,313	1,98	99 \pm 1	0	\leq LQ	\leq LQ	0	\leq LQ	\leq LQ	0	\leq LQ	\leq LQ
P + Talco	0,311	1,97	98 \pm 1	0	\leq LQ	\leq LQ	0	\leq LQ	\leq LQ	0	\leq LQ	\leq LQ

Fonte: Do autor.

Nota : \leq LQ – 0,044 U/mL ou 2,2%.

Após os diferentes tempos de incubação (n=3).

Tabela 3 - Atividade da α -amilase nas amostras de pancreatina armazenadas a 40°C e 0% de umidade relativa.

Amostras	Tempo Inicial			1 mês			3 meses			6 meses		
	Abs. Média	α -amilase (U/mL)	Atividade (%)									
Pancreatina (P)	0,309	1,96	98 \pm 0,9	0,193	1,22	61,0 \pm 0,7	0,104	0,66	33,0 \pm 0,7	0,005	\leq LQ	\leq LQ
P + Ác. Cítrico	0,313	1,98	99 \pm 0,9	0,042	0,27	13,3 \pm 0,5	0,005	\leq LQ	\leq LQ	0	\leq LQ	\leq LQ
P + Sacarose	0,309	1,96	97 \pm 0,9	0,248	1,57	79,5 \pm 0,9	0,164	1,04	52,0 \pm 0,7	0,035	0,22	11,0 \pm 0,8
P + Manitol	0,311	1,97	98 \pm 1	0,215	1,36	68,0 \pm 0,6	0,105	0,66	33,0 \pm 0,6	0,016	0,09	4,5 \pm 0,5
P + Celulose	0,312	1,97	98 \pm 1	0,008	0,05	2,5 \pm 0,1	0	\leq LQ	\leq LQ	0	\leq LQ	\leq LQ
P + Estearato de Mg	0,313	1,98	99 \pm 1	0,137	0,87	43,5 \pm 0,7	0,056	0,35	17,5 \pm 0,6	0,015	0,09	4,5 \pm 0,5
P + Talco	0,311	1,97	98 \pm 1	0,054	0,34	17,0 \pm 0,7	0,015	0,09	4,5 \pm 0,3	0	\leq LQ	\leq LQ

Fonte: Do autor.

Nota : \leq LQ – 0,044 U/mL ou 2,2%.

Após os diferentes tempos de incubação (n=3)

Quando a α -amilase foi analisada após 1 mês armazenada a 40°C e 0% de umidade relativa, foi possível observar uma queda de 39,0% em sua atividade quando armazenada na ausência de excipientes. Nesta condição, a sacarose e o manitol quando em misturas (1:1) com a amostra de pancreatina mostraram efeito protetor sobre a enzima. Nestes casos, a atividade enzimática da α -amilase foi mantida em 79,5% e 68,0% respectivamente. Já os demais excipientes não foram tão eficientes quanto a proteção visto que as amostras armazenadas em mistura com ácido cítrico, celulose, estearato de magnésio e talco apresentaram atividade enzimática para α -amilase inferior do que a pancreatina armazenada na ausência de excipientes. Após o armazenamento durante 3 meses a 40°C e 0% de umidade relativa, a atividade da α -amilase sofreu um decréscimo em todas as amostras em relação ao tempo de 1 mês. O excipiente sacarose ainda apresentou um efeito protetor sobre a enzima, mantendo sua atividade em 52,0%, quando a amostra de pancreatina sem excipiente apresentou uma atividade de 33,0%. Após 3 meses, a presença dos excipientes ácido cítrico e celulose fizeram com que a atividade da α -amilase ficasse abaixo do limite de quantificação ($LQ \leq 2,2\%$). As misturas com o excipiente estearato de magnésio e talco induziram atividade enzimática inferior a amostra do padrão de pancreatina pura. Em 6 meses nesta condição de armazenamento, a enzima α -amilase apresentou uma atividade menor que o limite de quantificação na ausência de excipientes. Em misturas com os excipientes ácido cítrico, celulose e talco foi observado queda total de atividade enzimática enquanto em mistura com sacarose, manitol e estearato de magnésio a atividade enzimática foi de 11%, 4,5% e 4,5%, respectivamente.

5.1.3 Atividade da enzima lipase

Para a determinação da porcentagem de atividade da enzima o seguinte cálculo foi realizado considerando como 100% de atividade a média da absorbância obtida do padrão de pancreatina contendo 6,0 U/mL de lipase.

0,353 ----- 100% de atividade enzimática

Média absorbância da amostra ----- X% atividade enzimática da amostra.

As tabelas 4 e 5 apresentam os valores obtidos a partir das amostras armazenadas a 40°C e 75% de umidade e 40°C e 0% de umidade, respectivamente.

A lipase apresentou um perfil de degradação bem semelhante em ambas as condições de armazenamento, diferenciando-se mais em relação ao efeito protetor dos excipientes sobre a enzima. Dentre todas as enzimas analisadas na amostra de pancreatina, a lipase foi a que mais resistiu as condições de armazenamento (40°C e 75% de umidade relativa e 40°C e 0% de umidade relativa).

Quando analisada após armazenada de 1 mês a 40°C e 75% de umidade relativa, a enzima lipase apresentou uma atividade de $66,3 \pm 0,9\%$ quando em ausência de excipientes. O único excipiente que apresentou efeito protetor foi a sacarose, mantendo atividade enzimática em $88,7 \pm 0,9\%$. A presença dos demais excipientes (ácido cítrico, manitol, celulose, estearato de magnésio e talco) fez com que a atividade enzimática fosse inferior do que amostra do padrão de pancreatina pura. Após 3 meses de armazenamento, nesta mesma condição, foi observado o mesmo perfil de queda de atividade. A sacarose continuou apresentando efeito protetor mantendo a atividade da lipase em $50,1 \pm 0,4\%$ enquanto na ausência de excipiente foi observada uma atividade de apenas $24,4 \pm 0,7\%$. Em 6 meses de armazenamento, a amostra do padrão de pancreatina em mistura com manitol, estearato de magnésio e talco apresentaram decréscimo total de atividade da lipase.

Quando armazenada a 40°C e 0% de umidade relativa a lipase armazenada na ausência de excipiente apresentou atividade de $60,6 \pm 0,5\%$ após 1 mês. Ao contrário do observado na condição úmida o excipiente sacarose não apresentou um efeito protetor. Apenas a mistura com excipiente estearato de magnésio apresentou atividade desta enzima cerca de 10% superior a amostra do padrão de pancreatina puro. No entanto, após 3 meses de armazenamento, foi observado que este excipiente agiu positivamente na atividade da lipase (a amostra de pancreatina apresentou cerca de 21,0% e nesta mistura 47,3% de atividade), ou seja, mais que duplicou a atividade da lipase. Após 6 meses de armazenamento o estearato de magnésio ainda manteve efeito protetor sobre a enzima, a atividade observada foi de $23,7 \pm 0,6\%$ enquanto na ausência de excipientes a atividade enzimática foi de $7,6 \pm 0,6\%$. O efeito do estearato de magnésio sob a atividade da enzima é interessante. Isto pode ser atribuído a afinidade da enzima com excipientes hidrofóbicos (estearato) que interage com o sítio ativo da enzima, provavelmente reduzindo, a distorção tridimensional da lipase (SCALVINI; PIOMELLI, 2015). Já a mistura com manitol apresentou decréscimo total de atividade e as misturas com ácido cítrico e sacarose apresentaram atividade inferior a amostra pura de pancreatina.

Tabela 4 - Atividade da lipase nas amostras de pancreatina armazenadas a 40°C e 75% de umidade relativa.

Amostras	Tempo Inicial			1 mês			3 meses			6 meses		
	Abs. Média	Lipase (U/mL)	Atividade (%)									
Pancreatina (P)	0,353	6,00	100 ± 0,2	0,234	3,98	66,3 ± 0,9	0,086	1,46	24,4 ± 0,7	0,027	0,46	7,6 ± 0,6
P + Ác. Cítrico	0,345	5,86	97,7 ± 0,2	0,088	1,50	24,9 ± 0,7	0,034	0,60	9,6 ± 0,7	0,005	≤LQ	≤LQ
P + Sacarose	0,350	5,96	99,3 ± 0,7	0,313	5,34	88,7 ± 0,9	0,177	3,02	50,1 ± 0,4	0,054	0,90	15,0 ± 0,9
P + Manitol	0,346	5,98	98,2 ± 0,4	0,097	1,55	27,5 ± 0,2	0,026	0,45	7,4 ± 0,4	0	≤LQ	≤LQ
P + Celulose	0,347	5,98	98,3 ± 0,9	0,171	2,91	48,4 ± 0,2	0,053	0,90	15,0 ± 0,9	0,012	0,20	3,4 ± 0,5
P + Estearato de Mg	0,346	5,98	98,2 ± 0,9	0,082	1,40	23,2 ± 0,5	0,025	0,42	7,1 ± 0,8	0	≤LQ	≤LQ
P + Talco	0,346	5,98	98,1 ± 0,9	0,087	1,50	24,6 ± 0,8	0,025	0,42	7,1 ± 0,7	0	≤LQ	≤LQ

Fonte: Do autor.

Nota: ≤LQ – 0,199 U/mL ou 3,3% de atividade
Após os diferentes tempos de incubação (n=3).

Tabela 5 - Atividade da lipase nas amostras de pancreatina armazenadas a 40°C e 0% de umidade relativa.

Amostras	Tempo Inicial			1 mês			3 meses			6 meses		
	Abs. Média	Lipase (U/mL)	Atividade (%)									
Pancreatina (P)	0,353	6,00	100 ± 0,2	0,214	3,53	60,6 ± 0,5	0,074	1,26	21,0 ± 0,9	0,027	0,46	7,6 ± 0,6
P + Ác. Cítrico	0,345	5,86	97,7 ± 0,2	0,154	2,64	43,6 ± 0,5	0,053	0,90	15,0 ± 0,5	0,010	0,16	2,8 ± 0,4
P + Sacarose	0,350	5,96	99,3 ± 0,7	0,105	1,80	29,7 ± 0,7	0,045	0,76	12,7 ± 0,9	0,012	0,20	3,4 ± 0,6
P + Manitol	0,346	5,98	98,2 ± 0,4	0,088	1,50	24,9 ± 0,8	0,035	0,60	9,9 ± 0,5	0	≤LQ	≤LQ
P + Celulose	0,347	5,98	98,3 ± 0,9	0,133	2,26	37,7 ± 0,9	0,062	1,05	17,6 ± 0,2	0,027	0,46	7,6 ± 0,5
P+Estearato de Mg	0,346	5,98	98,2 ± 0,9	0,233	3,96	66,0 ± 0,8	0,167	2,84	47,3 ± 0,6	0,083	1,41	23,7 ± 0,6
P + Talco	0,346	5,98	98,1 ± 0,9	0,158	2,70	44,7 ± 0,7	0,084	1,44	23,8 ± 0,3	0,032	0,54	9,1 ± 0,3

Fonte: Do autor.

Nota: ≤LQ – 0,199 U/mL ou 3,3% de atividade

Após os diferentes tempos de incubação (n=3)

A água, através de várias ligações do tipo hidrogênio-hidrogênio desempenha uma importante função na enzima ao manter a sua conformação nativa. Assim sendo, uma reação de hidrólise enzimática necessita de dois grandes aspectos: a existência de uma interface orgânica/aquosa e a adsorção de enzima nesta interface. (ROODNEY; WHEATEHRLEY, 2001).

As lipases apresentam alguns elementos de estruturas secundárias que na ausência de interfaces tornam o seu sítio ativo inacessível através do conhecimento deste, ou seja, passa a apresentar conformação fechada. Porém, quando ocorrem interfaces hidrofóbicas, permitem uma abertura da estrutura das lipases (AVELAR et al., 2013).

5.1.4 Atividade da enzima protease

Para a determinação da porcentagem de atividade desta enzima o seguinte cálculo foi realizado considerando como 100% de atividade a média da absorbância obtida do padrão pancreatina contendo protease a 14,0 U/mL.

$$\begin{array}{l} 0,410 \text{ -----} 100\% \text{ de atividade enzimática} \\ \text{Média absorbância da amostra -----} X\% \text{ atividade enzimática da amostra.} \end{array}$$

As tabelas 6 e 7 apresentam os valores obtidos a partir das amostras armazenadas a 40°C e 75% de umidade e 40°C e 0% de umidade, respectivamente.

Após o armazenamento durante 1 mês a 40°C e 75% de umidade relativa (tabela 6), a atividade da protease reduziu drasticamente sendo observado apenas $8,3 \pm 0,5\%$ de atividade. A presença dos excipientes sacarose e celulose não afetou significativamente a atividade desta enzima, este efeito é devido à presença de centros quirais na enzima (aminoácidos) (WATERMAN et al., 2012). Já a presença do manitol, estearato de magnésio e o talco prejudicaram ainda mais a atividade da protease. Por outro lado, o ácido cítrico quando misturado com o padrão de pancreatina na proporção (1:1, m/m) fez com que a atividade desta enzima fosse cerca de duas vezes maior quando comparado com o padrão de pancreatina puro. Podendo assim concluir que houve efeito protetor do ácido cítrico em condições de

armazenamento úmida diferente da eficácia do mesmo quando em condições de armazenamento seco.

A protease quando analisada após 1 mês armazenada a 40°C e 0% de umidade relativa (amostra seca), demonstrou decréscimo total de atividade quando na ausência de excipientes. Nesta condição, é possível afirmar a inativação total desta enzima. O mesmo foi observado quando a amostra foi misturada com o excipiente ácido cítrico. Porém, alguns excipientes demonstraram efeito levemente protetor sobre a enzima. Quando a pancreatina foi misturada com a celulose foi possível observar a atividade de $11 \pm 0,5\%$.

Após o armazenamento de 3 e 6 meses a enzima protease apresentou decréscimo total de atividade em ambas as condições de armazenamento.

Foi determinada uma grande variação nas atividades proteolíticas. Os resíduos de aminoácidos (principalmente cisteína e as metaloprotease podem interferir na atividade da enzima. Provavelmente, essas estruturas combinam com aminoácidos essenciais à formação tridimensional da proteína que altera a sua estabilidade, podendo diminuir a atividade enzimática (BUXBAUM, 2011).

Em termos gerais, com os resultados obtidos após o estudo em câmara de estabilidade é possível afirmar que a protease foi o componente da pancreatina que teve a sua atividade mais afetada depois do período de armazenamento. Por outro lado, a lipase foi a que manteve maior atividade considerando até 3 meses de armazenamento. Nas condições empregadas, não se recomenda um armazenamento de 6 meses pois as enzimas apresentaram atividades inferiores a 25%.

Adicionalmente, dentre os excipientes avaliados, constatou-se que deve ser evitado formulações de pancreatina contendo ácido cítrico e manitol, principalmente ao considerar a atividade da lipase, que é considerada a que tem maior atuação no biofármaco em questão.

Tabela 6 - Atividade da protease nas amostras de pancreatina armazenadas a 40°C e 75% de umidade relativa.

Amostras	Tempo Inicial			1 mês			3 meses			6 meses		
	Abs. Média	Protease (U/mL)	Atividade (%)									
Pancreatina (P)	0,410	14,00	100 ± 0,3	0,034	1,16	8,3 ± 0,5	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ
P + Ác. Cítrico	0,404	13,80	98,5 ± 0,4	0,081	2,77	19,8 ± 0,5	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ
P + Sacarose	0,408	13,93	99,5 ± 0,7	0,036	1,23	8,8 ± 0,5	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ
P + Manitol	0,405	13,80	98,5 ± 0,8	0,014	0,48	3,4 ± 0,6	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ
P + Celulose	0,404	13,80	98,5 ± 0,8	0,033	1,13	8,0 ± 0,5	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ
P+Estearato de Mg	0,406	13,86	99,0 ± 0,6	0,012	0,41	2,9 ± 0,6	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ
P + Talco	0,403	13,76	98,3 ± 0,8	0,022	0,75	5,4 ± 0,5	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ

Fonte: Do autor.

Nota: ≤LQ – 0,365 U/mL ou 2,6% de atividade
Após os diferentes tempos de incubação (n=3).

Tabela 7 - Atividade da protease nas amostras de pancreatina armazenadas a 40°C e 0% de umidade relativa.

Amostras	Tempo Inicial			1 mês			3 meses			6 meses		
	Abs. Média	Protease (U/mL)	Atividade (%)									
Pancreatina (P)	0,410	14,0	100 ± 0,3	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ
P + Ác. Cítrico	0,404	13,80	98,5 ± 0,4	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ
P + Sacarose	0,408	13,93	99,5 ± 0,7	0,012	0,41	2,9 ± 0,6	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ
P + Manitol	0,405	13,80	98,5 ± 0,8	0,019	0,65	4,6 ± 0,4	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ
P + Celulose	0,404	13,80	98,5 ± 0,8	0,045	1,54	11,0 ± 0,5	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ
P+Estearato de Mg	0,406	13,86	99,0 ± 0,6	0,012	0,41	2,9 ± 0,6	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ
P + Talco	0,403	13,76	98,3 ± 0,8	0,022	0,75	5,4 ± 0,5	0	≤LQ	≤LQ	0	≤LQ	≤LQ

Fonte: Do autor.

Nota: ≤LQ – 0,365 U/mL ou 2,6% de atividade
Após os diferentes tempos de incubação (n=3).

5.2 RESULTADOS DOS TESTES DE ATIVIDADE NO BIOFÁRMACO CREON 10.000

A tabela 8 apresenta os dados das curvas de calibração obtidos para análise da amostra do biofármaco comercial.

Tabela 8 - Resultados dos valores das curvas analíticas para determinação das atividades das três enzimas.

	α -amilase	Lipase	Protease
Faixa de concentração	0,065 a 0,326 $\mu\text{mol/mL}$ de glicose	4,0 a 8,0 U/mL	7,0 a 21,0 U/mL
Equação da Reta	$y = 1,675x + 0,0046$	$y = 0,030x + 0,0313$	$y = 0,037x + 0,0711$
Coefficiente de correlação (R^2)	0,999	0,996	0,996

Fonte: Do autor

Analisando-se a curva de calibração pode-se concluir que a absorbância apresenta correlação linear com a faixa de concentração estudada das enzimas de acordo com a tabela 8, pois os coeficientes de correlação R^2 da curva obtida, através do ajuste dos dados experimentais, apresentou valores acima de 0,99, satisfazendo o critério de linearidade. Além disso, nota-se uma distribuição dos pontos indicando ausência de tendências e erros. Portanto conclui-se que a técnica empregada, apresenta linearidade na faixa de interesse.

5.2.1 Atividade da enzima α -amilase

O procedimento adotado para a determinação da porcentagem de atividade desta enzima foi feito baseando-se no mesmo cálculo empregado nas amostras de padrão de pancreatina e nas misturas binárias.

A tabela 9 apresenta os valores obtidos a partir das amostras armazenadas a 40°C e 75% de umidade relativa e 40°C e 0% de umidade relativa.

Tabela 9 - Atividade da α -amilase nas amostras do biofármaco Creon 10.0000.

Amostras	Tempo Inicial		1 mês		3 meses	
	α -amilase (U/mL)	Atividade (%)	α -amilase (U/mL)	Atividade (%)	α -amilase (U/mL)	Atividade (%)
Pó úmido	1,80	90,2 \pm 0,4	0,25	12,5 \pm 0,3	0,063	3,2 \pm 0,5
Pó seco	1,83	91,5 \pm 0,3	1,10	55,1 \pm 0,6	0,475	23,5 \pm 0,7
Cápsula úmida	1,85	92,4 \pm 0,6	0,25	12,5 \pm 0,4	0,114	5,7 \pm 0,6
Cápsula seca	1,81	90,3 \pm 0,5	1,38	69,3 \pm 0,7	0,532	26,6 \pm 0,8

Fonte: Do autor.

Nota: Nas duas condições de armazenamento: a 40°C e 75% de umidade relativa e 40°C e 0% de umidade relativa (n=3).

A α -amilase presente no biofármaco Creon 10.000, mostrou um comportamento distinto entre as duas condições de armazenamento. A 40°C e 75% de umidade relativa, em apenas 1 mês já foi possível observar uma queda drástica de atividade. A atividade diminuiu para cerca de 12,5% mostrando que a umidade exerce uma forte influência provocando uma distorção na estrutura da enzima. O mesmo perfil foi observado quando a mesma foi analisada após 3 meses onde houve uma diminuição na atividade enzimática para valores inferiores a 5,7%. É interessante observar que mesmo com a proteção da cápsula, constituída macrogol, ftalato de hipromelose, álcool cetílico, citrato de trietila, dimeticona, gelatina, óxido de ferro anidro (III), óxido de ferro hidratado (III), óxido de ferro (II, III), dióxido de titânio e laurilsulfato de sódio, a atividade da enzima foi prejudicada. Isso indica que a ação do medicamento comercial é comprometida nesta condição, considerando a atividade da α -amilase.

Quando a α -amilase foi analisada após 1 mês armazenada a 40°C e 0% de umidade relativa foi possível observar uma maior preservação da atividade da enzima em questão. Constatou-se que a atividade presente era de 55,1% e 69,3% nas amostras em pó e capsula, respectivamente. Transcorridos três meses foi observada uma queda de atividade para 23,5% e 26,6% nas amostras em pó e cápsula, respectivamente. Também neste caso as cápsulas não tiveram um efeito de proteção sobre o princípio ativo.

É importante notar que em apenas 3 meses de armazenamento a 40°C houve uma diminuição de cerca de 75% na atividade desta enzima. Isso induz a concluir que a temperatura prejudica a eficácia do medicamento quando o mesmo for ingerido após este período. Além disso, se a temperatura for aliada a umidade este efeito torna-se demasiadamente prejudicial.

5.2.2 Atividade da enzima lipase

A tabela 10 apresenta os valores obtidos a partir das amostras armazenadas a 40°C e 75% de umidade relativa e 40°C e 0% de umidade relativa, respectivamente.

Tabela 10 - Atividade da lipase nas amostras do biofármaco Creon 10.0000.

Amostras	Tempo Inicial		1 mês		3 meses	
	Lipase (U/mL)	Atividade (%)	Lipase (U/mL)	Atividade (%)	Lipase (U/mL)	Atividade (%)
Pó úmido	5,48	91,3 ± 0,8	0,81	13,5 ± 0,7	0,49	8,2 ± 0,3
Pó seco	5,54	92,3 ± 0,5	3,84	64,0 ± 0,4	0,87	14,5 ± 0,7
Cápsula úmida	5,42	90,3 ± 0,3	1,56	26,0 ± 0,6	0,78	13,0 ± 0,8
Cápsula seca	5,63	93,8 ± 0,4	4,50	75,0 ± 0,3	0,98	16,3 ± 0,5

Fonte: Do autor.

Nota: Nas duas condições de armazenamento: a 40°C e 75% de umidade relativa e 40°C e 0% de umidade relativa (n=3).

A lipase presente no biofármaco Creon 10.000, mostrou um comportamento distinto entre as duas condições de armazenamento. A 40°C e 75% de umidade relativa, em apenas 1 mês já foi possível observar uma queda drástica de atividade. A atividade diminuiu para cerca de 13,5 % nas amostras de pó e 26% nas amostras em cápsula, mostrando que a umidade exerce uma forte influência provocando uma distorção na estrutura da enzima. O mesmo perfil foi observado quando a mesma foi analisada após 3 meses onde houve uma diminuição na atividade enzimática para valores inferiores a 13%. É interessante observar que mesmo com a proteção da cápsula, constituída macrogol, ftalato de hipromelose, álcool cetílico, citrato de trietila, dimeticona, gelatina, óxido de ferro anidro (III), óxido de ferro hidratado (III), óxido de ferro (II, III), dióxido de titânio e laurilsulfato de sódio, a atividade da enzima foi prejudicada. Isso indica que ação do medicamento comercial é comprometida nesta condição, considerando a atividade da lipase.

Quando a lipase foi analisada após 1 mês armazenada a 40°C e 0% de umidade relativa foi possível observar uma maior preservação da atividade da enzima em questão. Constatou-se que a atividade presente era de 64% e 75% nas amostras em pó e capsula, respectivamente. Transcorridos três meses foi observada uma queda de atividade para

14,5% e 16,3% nas amostras em pó e cápsula, respectivamente. Também neste caso as cápsulas não tiveram um efeito de proteção sobre o princípio ativo.

É importante notar que em apenas 3 meses de armazenamento a 40°C e 0% de umidade houve uma diminuição de cerca de 77% na atividade desta enzima. Isso induz a concluir que a temperatura prejudica a eficácia do medicamento quando o mesmo for ingerido após este período. Além disso, se a temperatura for aliada a umidade este efeito torna-se demasiadamente prejudicial.

5.2.3 Atividade da enzima protease

A tabela 11 apresenta os valores obtidos a partir das amostras armazenadas a 40°C e 75% de umidade relativa e 40°C e 0% de umidade relativa.

Tabela 11 - Atividade da protease nas amostras do biofármaco Creon 10.0000.

Amostras	Tempo Inicial		1 mês		3 meses	
	Protease (U/mL)	Atividade (%)	Protease (U/mL)	Atividade (%)	Protease (U/mL)	Atividade (%)
Pó úmido	13,50	96,4 ± 0,5	6,78	48,4 ± 0,4	3,43	24,5 ± 0,2
Pó seco	13,52	96,5 ± 0,3	11,5	82,3 ± 0,7	5,31	37,9 ± 0,3
Cápsula úmida	13,48	96,3 ± 0,6	10,9	77,9 ± 0,9	3,78	27,0 ± 0,8
Cápsula seca	13,54	96,7 ± 0,5	12,8	91,7 ± 0,3	6,02	43,0 ± 0,4

Fonte: Do autor.

Nota: Nas duas condições de armazenamento: a 40°C e 75% de umidade relativa e 40°C e 0% de umidade relativa (n=3).

A protease presente no biofármaco Creon 10.000, mostrou um comportamento distinto entre as duas condições de armazenamento. A 40°C e 75% de umidade relativa, em apenas 1 mês já foi possível observar uma queda drástica de atividade. A atividade diminuiu para cerca de 48,4 % nas amostras de pó e 77,9% nas amostras em cápsula, mostrando que a umidade exerce uma forte influência provocando uma distorção na estrutura da enzima. O mesmo perfil foi observado quando a mesma foi analisada após 3 meses onde houve uma diminuição na atividade enzimática para valores inferiores a 27%. É interessante observar que mesmo com a proteção da cápsula, constituída macrogol, ftalato de hipromelose, álcool cetílico, citrato de trietila, dimeticona, gelatina, óxido de ferro anidro (III), óxido de ferro

hidratado (III), óxido de ferro (II, III), dióxido de titânio e laurilsulfato de sódio, a atividade da enzima foi prejudicada. Isso indica que ação do medicamento comercial é comprometida nesta condição, considerando a atividade da protease.

Quando esta enzima foi analisada após 1 mês armazenada a 40°C e 0% de umidade relativa foi possível observar uma maior preservação da atividade da enzima em questão. Constatou-se que a atividade presente era de 82,3% e 91,7% nas amostras em pó e capsula, respectivamente. Transcorridos três meses foi observada uma queda de atividade para 37,9% e 43% nas amostras em pó e cápsula, respectivamente. Também neste caso as cápsulas não tiveram um efeito de proteção sobre o princípio ativo.

É importante notar que em apenas 3 meses de armazenamento a 40°C e 0% de umidade houve uma diminuição de cerca de 47% na atividade desta enzima. Isso induz a concluir que a temperatura prejudica a eficácia do medicamento quando o mesmo for ingerido após este período. Além disso, se a temperatura for aliada a umidade este efeito torna-se demasiadamente prejudicial.

5.3 RESULTADOS DE ATIVIDADE DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS AO TESTE DE ESTRESSE

A tabela 12 apresenta os dados das curvas de calibração obtidos para análise das amostras de padrão de pancreatina submetidas a diferentes condições usadas nos testes de estresse. Foi necessário realizar novas curvas devido ao fato destas análises terem sido executadas em períodos diferentes das anteriores. No entanto, as condições de análise foram semelhantes aquelas já descritas e, conseqüentemente, os resultados foram semelhantes aos obtidos previamente.

Tabela 12 - Dados das curvas analíticas.

	α -amilase	Lipase	Protease
Faixa de concentração	0,065 a 0,326 $\mu\text{mol/mL}$ de glicose	4,0 a 8,0 U/mL	7,0 a 21,0 U/mL
Equação da Reta	$y = 2,053x + 0,0909$	$y = 0,024x + 0,156$	$y = 0,038x + 0,1245$
Coefficiente de correlação (R^2)	0,999	0,996	0,996

Fonte: Do autor

Nota: Determinação espectrofotométrica das atividades das três enzimas nas amostras submetidas a diferentes condições usadas nos testes de estresse.

5.3.1 α -amilase

Substituindo os valores de absorbância no y da equação de reta obtida para esta enzima foi calculado a concentração de glicose em $\mu\text{mol/mL}$. Considerando que a amostra sem estresse contendo 187,5 U de α -amilase/mL consome 10,46 $\mu\text{mol/mL}$ de glicose foi determinado o teor de atividade ainda remanescente após cada uma das condições de estresse teste.

De acordo com os dados observados na tabela 13 foi possível inferir que a atividade da α -amilase somente foi mantida sob a condição de pH 9,0 e submetida a luz UV. Tanto o estresse sob pH 9,0 quanto a luz UV não conduziu a grandes alterações na atividade enzimática, sendo que os valores de atividade encontrados e apresentados na Tabela 13, correspondem a 103,9 e 100,2% de ação da enzima, respectivamente. Tais dados demonstram a preservação da conformação estrutural da α -amilase, como também a não degradação da mesma, conforme descrito por Staub et al (2011). Adicionalmente, as demais condições de estresse foram extremamente prejudiciais à atividade desta enzima sendo observadas atividades menores que 2,1%.

Tabela 13 - Resultados da atividade de α -amilase nas amostras submetidas.

Amostras	Fator de Diluição	Absorbância Média \pm DP	Concentração U/mL \pm DP	Atividade (%)
Sem estresse	100x	0,306 \pm 0,005	187,80 \pm 0,05	100,2
pH 3	sem	0,153 \pm 0,001	0,54 \pm 0,02	0,3
pH 9	100x	0,315 \pm 0,003	194,80 \pm 0,04	103,9
pH 11	sem	0,109 \pm 0,002	0,16 \pm 0,04	0,1
Temperatura	sem	0,543 \pm 0,004	3,94 \pm 0,06	2,1
Oxidação	sem	0,161 \pm 0,002	0,62 \pm 0,04	0,3
Luz UV	100x	0,307 \pm 0,002	187,88 \pm 0,04	100,2

Fonte: Do autor.

Nota: Submetidas ao teste de estresse (n=3).

5.3.2 Lipase

Substituindo os valores de absorbância no y da equação de reta obtida foram obtidos os valores correspondentes à concentração em U/mL de lipase e também da % de atividade remanescente. Nestes testes foi considerado que as amostras deveriam ter 15 U/mL da enzima. Em todas as condições foi observado que houve alteração na atividade da lipase sendo a oxidação o efeito que induziu uma menor perda da atividade (cerca de 67,8%), mesmo assim, considerado um valor alto já que esta enzima é a principal dentro do complexo da pancreatina.

Tabela 14 - Resultados da atividade de lipase nas amostras.

Amostras	Fator de Diluição	Absorbância Média \pm DP	Concentração U/mL \pm DP	Atividade (%)
Sem estresse	2,5X	0,313 \pm 0,003	16,35 \pm 0,16	109
pH 3	sem	0,215 \pm 0,006	2,46 \pm 0,07	15,4
pH 9	2,5X	0,292 \pm 0,006	14,1 \pm 0,40	94,4
pH 11	sem	0,195 \pm 0,004	1,64 \pm 0,06	10,9
Temperatura	sem	0,183 \pm 0,002	1,13 \pm 0,03	7,5
Oxidação	sem	0,272 \pm 0,002	4,83 \pm 0,04	32,2
Luz UV	sem	0,177 \pm 0,002	0,88 \pm 0,03	5,9

Fonte: Do autor.

Nota: Submetidas ao teste de estresse (n=3).

5.3.3 Protease

Nestes testes foi considerado que as amostras também deveriam ter 187,5 U/mL de protease enzima. As condições que preservaram melhor a atividade desta enzima foram em pH 9,0 e também a oxidação. As demais condições foram extremamente prejudiciais na atividade da enzima em questão.

Tabela 15 - Resultados da atividade de protease nas amostras.

Amostras	Fator de Diluição	Absorbância Média ± DP	Concentração U/mL ± DP	Atividade (%)
Sem estresse	13x	0,677 ± 0,003	188,02 ± 0,82	100,3
pH 3	sem	0,415 ± 0,006	7,60 ± 0,11	4,1
pH 9	13x	0,527 ± 0,001	136,98 ± 0,26	73,1
pH 11	sem	0,384 ± 0,003	6,79 ± 0,05	3,6
Temperatura	sem	0,255 ± 0,003	3,41 ± 0,03	1,8
Oxidação	13x	0,423 ± 0,002	101,58 ± 0,66	54,1
Luz UV	sem	0,277 ± 0,001	3,99 ± 0,01	2,1

Fonte: Do autor.

Nota: Submetidas ao teste de estresse (n=3).

É importante frisar que para todas as três enzimas que compõe e pancreatina tanto a exposição em pH ácido, pH extremamente básico (pH 11,0) e temperatura (70°C durante 60 minutos) induz a perdas consideráveis da atividade das três enzimas. Desta forma, cuidados referentes à manutenção do pH apropriado e também a temperatura durante o preparo e armazenamento das formulações contendo a pancreatina devem ser tomados.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliada a estabilidade da pancreatina com excipientes farmacêuticos em função da temperatura e da umidade a qual foi exposta. Foi possível avaliar a influência dos excipientes na atividade das principais enzimas de sua composição. Em geral, pela análise espectrofotométrica, foi possível notar que houve queda significativa da atividade α -amilase e protease a partir de 1 mês de armazenamento a 40°C e 75% de umidade relativa. No caso da protease houve ainda queda da atividade mesmo na ausência de umidade sendo a enzima mais susceptível a degradação. Por outro lado, apesar de ter sido observado diminuição da atividade, a lipase foi a enzima que apresentou maior estabilidade. Com base nos resultados, pôde-se concluir ainda que as características dos excipientes podem afetar a estabilidade das enzimas e conseqüentemente sua atividade. A sacarose mostrou-se o melhor excipiente com efeito protetor sobre as enzimas α -amilase e lipase quando as amostras foram armazenadas sob 40°C e 75% de umidade relativa. O estudo de atividade enzimática do biofármaco Creon 10.000, mostrou que as amostras em pó e em cápsula mesmo após 3 meses em ambas as condições de armazenamento apresentou uma diminuição significativa da atividade para α -amilase, protease e lipase. De acordo com os dados dos testes de estresse, a exposição em pH 3,0, pH 11,0 e temperatura (70°C durante 60 minutos) induz a perdas consideráveis da atividade das três enzimas que compõe a pancreatina. Certa atenção deverá ser dispensada referente ao pH, temperatura e umidade durante o preparo das formulações farmacêuticas de pancreatina e a forma adequada de armazenamento dos medicamentos que possuem este princípio ativo.

REFERÊNCIAS

ANSEL, H. C.; ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G. **Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems**. Philadelphia, 2011.

ANSEL, H. C. et al. Sólidos orais, cápsulas, comprimidos e sistemas de liberação controlada. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 55, de 14 de novembro de 2012. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5b22ac004d9a646fb63ff7c116238c3b/27+de+novembro+RDC+55_2012+--+Detergentes+Enzimaticos.pdf?MOD=AJPERES>.
Acesso em: fev. de 2015.

AVELAR, M. H. M.; et al. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipases extract power from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 452-458, 2013.

BARRON, M. D. Stability testing operations. **Pharmaceutical Technology Analytical Chemistry & Testing**. 2003. p. 14-21.

BLESSY, M.; et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2013.

BORGSTON, B.; BROCKMAN, H. L. **Lipases**. Amsterdam: Elsevier, 1984.

BRASIL. Informe técnico nº 1, de 15 de julho de 2008. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/informes/2008/01_160708.htm>. Acesso em: out de 2014.

BRENA, B. M.; PAZOS, C.; FRANCO, F., L.; BATISTA, V. F. Chromatographic methods for amylases. **Journal of Chromatography**, v. 684, p. 217-237, 1996.

BUENO, T. Obtenção de concentrados de ácidos poli-insaturados por hidrólise enzimática do óleo de soja. 2005. 102f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química de Lorena – SP. 2005.

BUXBAUM, E. **Biophysical chemistry of proteins**. Springer: New York, 2011.

CAHILL, D. J. Protein and antibody arrays and their medical applications. **Journal of Immunological Methods**, v. 250, n.1, p. 81-91, 2001.

CARVALHO, J. P.; et al. Estabilidade de medicamentos no âmbito farmacológico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 34, n. 6, p. 22-7, 2005.

CELESTINO, J. R.; et al. Aspergillus 6V4, a strain isolated from manipueira, produces high amylases levels by using wheat bran as a substrate. **Enzyme Research**, 2014.

DHITAL, S.; GIDLEY, M. J.; WARREN, F. J. Inhibition of amylase activity by cellulose: Kinect analysis and nutritional implications. **Carbohydrate Polymers**, n. 123, p. 305-312, 2015.

FERREIRA, A. O.; VILLANOVA, J. Excipientes e adjuvantes farmacotécnicos. São Paulo, 2006. Disponível em:
<http://www.acesomagistral.com.br/technosupport/documentos/curso_excipientes_farmacotecnicos_revisado.doc>. Acesso em: ago. de 2015.

FREITAS, L. S.; MARTINS, E. S.; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 21, n.4 p226-232, 2014.

GOLIGHTLY, L. K.; et al. Pharmaceutical excipients. Adverse effects associated with inactive ingredients in drug products. **Journal of Medical Toxicology**, v. 3, n. 2, p.128-65, 1988.

International Conference on Harmonisation (ICH). Official web site. Disponível em:
<<http://www.ich.org>>. Acesso em março de 2015.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

KANWAR, S. S.; et al. Methods for inhibition of residual lipase activity in colorimetric assay: A comparative study. **Indian journal of biochemistry and biophysics**, v. 42, n. 4, p. 233, 2005.

KOSHLAND, Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. **Biological Reviews**, v.28, p. 416-436, 1953.

KUMAR, C. Ganesh; TAKAGI, Hiroshi. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology advances**, v. 17, n. 7, p. 561-594, 1999.

LOPES L. S.; et al. Validation of a UV spectrophotometric method for determination of proteolytic activity of enzymatic detergents, n. 16, p. 445-448, 2013.

MAAREL, V. D.; et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**. v.94, p.137-155, 2002.

MAURER, K. H. Detergent proteases. **Current opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 330-334, 2004.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p.245-251, 2013.

MENDES, A. A.; et al. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores lipídicos. **Química Nova**, v.28, n.2, p. 296-305, 2005.

MIAU, M.; et al. Interaction mechanism between green tea extract and human α -amylase for reducing starch digestion. **Food chemistry**, v. 186, p. 20-25, 2015.

MOHAMED A. et al. New colorimetric method for lipases. **American Journal of Analytical Chemistry**, n. 4, p. 442-444, 2013.

MORAES, G. H. K.; et al. Perfil enzimático de α -amilase, lipase e tripsina do pâncreas e crescimento do fígado, intestino e pâncreas de frangos de corte na fase de 1 a 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n.11, p. 2188-2192, 2009.

NIELSEN, J. E.; BORCHERT, T. V. Protein engineering of bacterial amylases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 253-274, 2000.

O' KEEFE, S.J.; CARIEM, A. K.; LEVY, M. The exacerbation of pancreatic endocrine dysfunction by potent pancreatic exocrine supplements in patients with chronic pancreatitis. **Journal Clinical Gastroenterol**, v. 32, n.4, p. 319-23, 2001.

OLIVA, A.; LLABRÉS, M.; FARIÑA, J. B.; Data analysis in stability studies of biopharmaceutical drugs with isothermal and non-isothermal assays. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 717-730, 2011.

OLIVEIRA J.; JORGE G.; MILHEIRO M.; SOUSA F. C. Pancreatite autoimune e diagnóstico diferencial com a neoplasia do pâncreas: A propósito de um caso clínico. **Journal Portuguese Gastrenterol**, Lisboa, v. 19, n. 1, 2012.

OLLIS, D. L.; et al. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Engineering Desing and Selection**, v. 5, n. 3, p.197-211, 1992.

PANDEY, A.; et al. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.31, p. 135-152, 2000.

PEREIRA, C. A.; et al. Inibição de enzimas digestivas por extratos de Hoodia gordonii utilizado no tratamento da obesidade. **Revista Brasileira de Biociência**, Porto Alegre, v. 9, n. 3, p. 265-269, 2010.

PRINTZ, M.; FRIESS, W. Simultaneous detection and analysis of protein aggregation and protein unfolding by size exclusion chromatography with post column addition of the fluorescent dye bisANS. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, p. 826-837, 2011.

RADER, R. A. (Re) defining biopharmaceutical. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 743-751, 2008.

RACAITYTE, K.; KIESSIG, S.; KÁLMÁN, F. Application of capillary zone electrophoresis and reversed phase high-performance liquid chromatography in the biopharmaceutical industry for the quantitative analysis of the monosaccharides released from a highly glycosylated therapeutic protein. **Journal of Chromatography A**, v.1079, p.354, 2005.

RAO, M. B.; et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Current opinion in chemical biology**, v. 6, n. 2, p. 145-150, 2002.

REDDY, N. S.; NIMMAGADDA, A.; R. A. O, SAMBASIVA, K. R. S. An overview of the microbial α -amylase family. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 645-648, 2004.

RIBELA, M. T. C. P.; et al. Analysis of human pituitary hormones for pharmaceutical applications. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 2, p. 103-126, 2006.

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

ROCHE. Medicamentos Biológicos. Disponível em:
<<http://www.roche.com.br/fmfiles/re7193008/pdf/medicamentosbiologicos1.pdf>> .
Acesso em: mar. de 2015.

ROODNEY, D.; WHEATERLEY, L. R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 947-953, 2001.

RUSSELL, J. Measuring amylase in cereal grains. **Journal Research Method**, v. 9, p. 11-13, 2007.

SARDA, L. DESNUELLE, P. Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochemistry and Biophysics*. **Acta**, v. 30, p. 513-521, 1958.

SCALVINI, L.; PIOMELLI, D.; MOR, D. Monoglyceride lipase: structure and inhibitors. **Structure**, v. 1, p. 1-2, 2015.

SEKHON, B. S. Biopharmaceuticals: an overview. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 34, p. 1-19, 2010.

SHARNA, A.; et al. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. **Catalysis Today**, v. 207, p. 93-100, 2012.

SCHRAG, J. D.; et al. The open conformation of a Pseudomonas lipase. **Structure**, v. 5, n.2, p.187-202, 1997.

SILVA, K. E. R. et al. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 20, n.2, p.129-135, 2009.

SINGH, K.; KAYASTHA, A. M. α -Amylase from wheat (*Triticum aestivum*) seeds: Its purification, biochemical attributes and active site studies. **Food chemistry**, v. 162, p. 1-9, 2014.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SKOOG, D. A.; et al. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.

SOARES, I. A. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

SOLÁ, R. J.; GRIEBENOW, K. E. Effects of glycosylation on stability of protein pharmaceuticals. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 98, n.4, p. 1223-1245, 2009.

STAUB, A.; et al. Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.55, p. 810-822, 2011.

UITDEHAAG, A.; X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the amylase family. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 6, p. 432-436, 1999.

VILLANOVA, J. C.; SÁ V. R. Formas sólidas. Guia prático para padronização: Formas Farmacêuticas orais sólidas e líquidas. 2. ed. São Paulo: **Pharmabooks**, p.6-18, 2009.

WALJEE A. K.; et al. Systematic review: pancreatic enzyme treatment of malabsorption associated with chronic pancreatitis. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 3, p.235-462, 2008.

WALSH, G. **Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biothecnology**, Chichester, 2. ed. p.5-6, 2003.

WATERMAN, K. C.; et al. Stabilization of pharmaceuticals to oxidative degradation. **Pharmaceutical development and technology**, v. 7, n. 1, p. 1-32, 2002.

WHASYLASCHUK W. R.; et al. Evaluation of Hydroperoxides in Common Pharmaceutical **Excipients**. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 96, n.1, p. 106-116, 2007.

WINKLER, F. K., D'ARCY, A., HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**. v. 343, p. 771-774, 1990.