

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**FERNANDA MENDES DE PAIVA OLÍMPIO**

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DE PANCREATINA ENCAPSULADA EM DIFERENTES  
HIDROGÉIS**

**Alfenas/MG**

**2017**

**FERNANDA MENDES DE PAIVA OLÍMPIO**

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DE PANCREATINA ENCAPSULADA EM DIFERENTES  
HIDROGÉIS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre em Química pela  
Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Jerusa Simone Garcia

Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes

**Alfenas/MG**

**2017**

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

Olimpio, Fernanda Mendes de Paiva.

Preparação, caracterização e estudos e liberação controlada de pancreatina encapsulada em diferentes hidrogéis / Fernanda Mendes de Paiva Olimpio. -- Alfenas/MG, 2017.

83 f.

Orientadora: Jerusa Simone Garcia.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2017.

Bibliografia.

1. Biopolímeros. 2. Liberação Controlada de Fármacos. 3. Enzimas imobilizadas. 4. Hidrogel. I. Garcia, Jerusa Simone. II. Título.

CDD-543

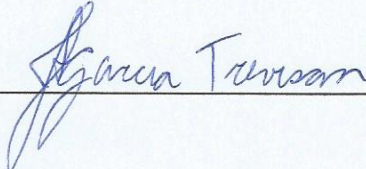
**Fernanda Mendes de Paiva Olímpio**

**“Preparação, Caracterização e Estudos de liberação controlada de Pancreatina encapsulada em diferentes hidrogéis”**

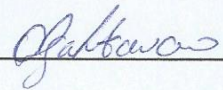
A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovado em: 28/04/17

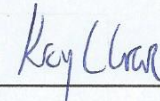
Profa. Dra. Jerusa Simone Garcia Trevisan  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Olga Luisa Tavano  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Keyller Bastos Borges  
Instituição: Universidade Federal de São João  
del-Rei - UFSJ

Assinatura: 

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me iluminar durante toda essa jornada, me dando forças para nunca desistir.

À minha família pelo apoio, suporte, carinho, paciência e incentivo.

Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade de estar realizando o mestrado.

À minha orientadora professora Dra. Jerusa Simone Garcia e ao meu co-orientador professor Dr. Adriano Aguiar Mendes pela disponibilidade e paciência no decorrer do nosso trabalho, e por acreditarem no meu potencial quando eu mesmo não era capaz de acreditar.

À CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À CPKelco pela doação da pectina, sem ela não teria sido possível realizar parte do trabalho.

Ao professor Dr. Keyller Bastos Borges, da Universidade Federal de São João del-Rei, pela disponibilidade em realizar as análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos técnicos Carolina Nasser Boscari e ao Lucas Ferrarezi pela prontidão no empréstimo de equipamentos.

Aos companheiros do LACfar que se tornaram uma verdadeira família, em especial à Renata Cristina Silva que foi meu braço direito no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos amigos da Turma de quinta pelos momentos de desabafo, choro, compreensão, apoio e carinho!

*“ A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos. ”*

Marcel Proust

## RESUMO

A pancreatina (complexo enzimático composto por  $\alpha$ -amilase, lipase e protease) é um biofármaco utilizado no tratamento de indivíduos que apresentam deficiência ou insuficiência na produção de enzimas pancreáticas. A instabilidade destas enzimas ao meio ácido pode comprometer suas atividades, diminuindo a eficácia dos tratamentos realizados. Na tentativa de preservar as atividades enzimáticas e proporcionar uma liberação retardada da pancreatina foram preparados hidrogéis de polímeros naturais, para atuarem como veículos da pancreatina que foi encapsulada em meio as matrizes poliméricas formadas. Os hidrogéis obtidos passaram por uma etapa de caracterização, por meio da espectroscopia de infravermelho, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de varredura, determinação do grau de intumescimento e construção de um perfil de intumescimento. Além disso, foram realizados estudos de liberação da pancreatina encapsulada nos hidrogéis e a liberação da pancreatina de uma formulação disponível comercialmente, o Creon<sup>®</sup>. O hidrogel de alginato, que apresentou os melhores resultados durante os estudos. De forma geral, todos os hidrogéis apresentaram baixo grau de intumescimento quando submetidos ao fluido gástrico simulado e alto grau de intumescimento, além de solubilização completa da matriz polimérica, promovendo a liberação das enzimas em fluido intestinal simulado. Dentre os três hidrogéis preparados e analisados, o hidrogel de alginato foi o que se destacou por apresentar maior eficiência de encapsulação e maior liberação das enzimas em pH similar ao do local de ação, por isso, ele foi utilizado para comparação com os resultados obtidos pelo Creon<sup>®</sup>, nos estudos de liberação da pancreatina. Esta comparação permitiu verificar que a liberação enzimática por meio do hidrogel de alginato foi mais rápida e completa, enquanto as minimicroesferas revestidas do Creon<sup>®</sup> não solubilizaram por completo até o final das análises.

**Palavras chave:** Biopolímeros. Liberação retardada. Enzimas pancreáticas. Encapsulação. Hidrogel.

## ABSTRACT

Pancreatin (enzymatic complex composed of  $\alpha$ -amylase, lipase and protease) is a biopharmaceutical used in the treatment of individuals who are deficient or insufficient in the production of pancreatic enzymes. The instability of these enzymes in the acidic medium can compromise their activities, reducing the effectiveness of the treatments performed. In an attempt to preserve enzymatic activities and to provide a delayed release of pancreatin, natural polymer hydrogels were prepared to act as vehicles for pancreatin which was encapsulated into their polymer matrices. The obtained hydrogels were characterized through infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, encapsulation efficiency, swelling degree and swelling profile. In addition, release studies of encapsulated pancreatin in the hydrogels and released from a commercially available formulation, Creon<sup>®</sup>, were performed. In general, all hydrogels had a low swelling degree when submitted to simulated gastric fluid and high swelling degree and complete solubilization of the polymer matrix, promoting the enzymes release in simulated intestinal fluid. Among the three hydrogels prepared and analyzed, the alginate hydrogel was distinguished by its higher encapsulation efficiency and enzymes release at pH similar to the action site, so it was used for comparison with the results obtained by Creon<sup>®</sup>, in the pancreatin release studies. This comparison showed that the enzymatic release by the alginate hydrogel was faster and more complete, whereas the Creon<sup>®</sup> coated micromicrospheres that did not dissolve until the end of the analyzes.

**Keywords:** Biopolymers. Delayed release. Pancreatic enzymes. Encapsulation. Hydrogel.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
Asp	Asparagina
C	Concentração
cm	Centímetro
°C	Graus Celsius
°C/min	Graus Celsius por minuto
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTGA	Primeira derivada da análise termogravimétrica
EC	Número de comissão de enzimas
EE	<b>Eficiência de encapsulação</b>
EL	Estudos de liberação
eq.	Equação
fd	Fator de diluição
<i>FDA</i>	<i>Food and drug administration</i>
FGS	Fluido gástrico simulado
FIS	Fluido intestinal simulado
FTIR-ATR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier-Refletância Total Atenuada ( <i>Fourier Transform InfraRed spectroscopy - Attenuated Total Reflectance</i> )
g	Gramma
G	Ácido gulurônico
GI	Grau de intumescimento
h	Hora
HA	Hidrogel de alginato
HC	Hidrogel de carragenana
<i>His</i>	Histidina
HP	Hidrogel de pectina
ICH	<b><i>International Conference on Harmonisation</i></b>
IR	Infravermelho
kDa	Quilo Daltons
kV	Quilovolt

LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M	Concentração molar
<b>M</b>	<b>Ácido manurônico</b>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Concentração milimolar
min	Minuto
μL	Microlitro
μmol/min	Micromol por minuto
μmol/mL	Micromol por mililitro
nm	Nanômetro
PI	Perfil de intumescimento
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
<i>s</i>	Desvio padrão
<i>S</i>	Coeficiente angular
SDS	<b>Dodecil sulfato de sódio</b>
<i>Ser</i>	Serina
<i>t</i>	Tempo
TG	Termogravimétrica
TGA	Análise termogravimétrica
U	Unidade de atividade enzimática
U/mL	Unidade de atividade enzimática por mililitro
U/mg	Unidade de atividade enzimática por miligrama
<i>USP</i>	Farmacopéia americana ( <i>United States Pharmacopoeia</i> )
UV-vis	Ultravioleta-visível
Vol.	Volume
%	Porcento
% (m/v)	Porcentagem massa por volume
% (v/v)	Porcentagem massa por massa

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação da estrutura da $\alpha$ -amilase.....	20
Figura 2 –	Representação das estruturas do complexo lipase pancreática-colipase em conformação fechada (E) e conformação aberta (E* ).....	22
Figura 3 –	Representação da formação de hidrogéis físicos ionotrópicos por meio de polímero aniônico. ....	26
Figura 4 –	Representação da estrutura do alginato de sódio, formado por várias unidades de ácido gulurônico (G) e manurônico (M).....	27
Figura 5 –	Representação da estrutura do hidrogel de alginato-Ca formado por reticulações iônicas, conhecida como “caixa de ovo”.....	27
Figura 6 –	Representação estrutural da $\kappa$ -carragenana.....	28
Figura 7 –	Representação da estrutura da pectina.....	29
Figura 8 –	Embalagem externa do Creon® 10.000 e cápsulas contendo minimicroesferas revestidas.....	31
Figura 9 –	Representação da reação de redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.....	38
Figura 10 –	Fotografia da precipitação das proteínas em presença de solução salina.....	46
Figura 11 –	Fotografia dos hidrogéis preparados, após a secagem.....	48
Figura 12 –	TGA e DTGA das amostras de hidrogel controle e carregado de (a) alginato, (b) carragenana e (c) pectina.....	49
Figura 13 –	Espectros de infravermelho comparando o hidrogel controle de alginato (a), carragenana (b) e pectina (c) com os respectivos hidrogéis carregados.....	51
Figura 14 –	Microscopias eletrônicas de varredura das amostras de hidrogel carregado de alginato (a), carragenana (c) e pectina (e), e hidrogel controle de alginato (b), carragenana (d) e pectina (f).....	52
Figura 15 –	Curva analítica para avaliar a atividade da $\alpha$ -amilase nos hidrogéis de alginato, carragenana e pectina.....	54
Figura 16 –	Curva analítica para avaliar a atividade da protease nos hidrogéis de alginato, carragenana e pectina.....	56
Figura 17 –	Fotografias dos hidrogéis de (a) alginato, (b) carragenana e (c) pectina, submetidos ao FGS, FIS e água destilada, após 2 h.....	62

Figura 18 – Grau de intumescimento dos hidrogéis de alginato, carragenana e pectina, após 2 h em FGS.....	64
Figura 19 – Gráfico do PI dos hidrogéis de alginato, carragenana e pectina.....	64
Figura 20 – Comparação da liberação de amilase (a), protease (b) e lipase (c) entre os hidrogéis de alginato, carragenana e pectina.....	68
Figura 21 – Comparação da liberação de amilase (a), protease (b) e lipase (c) entre o hidrogel de alginato carregado e o Creon <sup>®</sup> .....	70

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Excipientes presentes na formulação do Creon® 10.000.....	30
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudo das concentrações de soluções poliméricas e salinas empregadas no preparo dos hidrogéis de alginato e carragenana, em meio aquoso.....	34
Tabela 2 – Estudo das concentrações de soluções poliméricas e salinas empregadas no preparo dos hidrogéis em meio tamponado.....	35
Tabela 3 – Diferentes volumes de solução de glicose e de solução tampão, e ainda, as concentrações da solução de glicose empregadas na construção da curva analítica para avaliar a atividade da $\alpha$ -amilase.....	39
Tabela 4 – Dados médios de absorbância, atividade, balanço de massas e eficiência de encapsulação de $\alpha$ -amilase obtidos no preparo dos diferentes hidrogéis.....	55
Tabela 5 – Massas médias dos hidrogéis carregados, após o processo de secagem, e as respectivas atividades de $\alpha$ -amilase encapsulada por mg de hidrogel.....	56
Tabela 6 – Dados médios de absorbância, atividade, balanço de massas e eficiência de encapsulação de protease obtidos no preparo dos diferentes hidrogéis.....	57
Tabela 7 – Massas médias dos hidrogéis carregados, após o processo de secagem, e as respectivas atividades de protease encapsulada por mg de hidrogel.....	58
Tabela 8 – Dados médios de atividade, balanço de massas e eficiência de encapsulação de lipase, obtidos no preparo dos diferentes hidrogéis.....	59
Tabela 9 – Massas médias dos hidrogéis carregados, após o processo de secagem, e as respectivas atividades de lipase encapsulada por mg de hidrogel.....	60
Tabela 10 – Dados obtidos no teste de GI.....	62
Tabela 11 – Atividade enzimática apresentada pelos diferentes hidrogéis nos testes de eficiência de encapsulação (EE) e estudos de liberação (EL) da pancreatina, considerando uma massa de 200 mg.....	67

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>19</b>
2.1	A PANCREATINA ENQUANTO BIOFÁRMACO	19
<b>2.1.1</b>	<b><math>\alpha</math>-amilase</b>	<b>20</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Protease</b>	<b>21</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Lipase</b>	<b>21</b>
2.2	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS EMPREGADOS NAS FORMULAÇÕES DISPONÍVEIS COMERCIALMENTE	22
<b>2.2.1</b>	<b>Revestimento entérico: principal estratégia empregada pela indústria farmacêutica</b>	<b>23</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Encapsulação por meio de materiais entéricos</b>	<b>24</b>
2.2.2.1	Hidrogéis	25
2.2.2.1.1	<i>Biopolímeros</i>	26
2.3	CREON®: FORMULAÇÃO DISPONÍVEL COMERCIALMENTE UTILIZADA COMO MODELO	30
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
4.1	MATERIAIS	33
4.2	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS	33
4.3	PREPARO DOS HIDROGÉIS	34
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS	36
<b>4.4.1</b>	<b>Análise Termogravimétrica</b>	<b>37</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Espectroscopia de Infravermelho</b>	<b>37</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura</b>	<b>37</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Eficiência de Encapsulação dos Hidrogéis</b>	<b>38</b>
4.4.4.1	$\alpha$ -amilase	38
4.4.4.2	Protease	40
4.4.4.3	Lipase	40
4.4.4.3.1	<i>Hidrólise de palmitato de p-nitrofenila</i>	41

4.4.4.3.2	<i>Hidrólise do óleo de oliva emulsificado</i>	41
<b>4.4.5</b>	<b>Grau de Intumescimento dos Hidrogéis</b>	<b>42</b>
<b>4.4.6</b>	<b>Perfil de Intumescimento dos Hidrogéis</b>	<b>43</b>
<b>4.4.7</b>	<b>Estudos de Liberação da Pancreatina</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>45</b>
5.1	PREPARO DOS HIDROGÉIS	45
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS	48
<b>5.2.1</b>	<b>Análise Termogravimétrica</b>	<b>48</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Espectroscopia de Infravermelho</b>	<b>50</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura</b>	<b>52</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Eficiência de Encapsulação dos Hidrogéis</b>	<b>53</b>
5.2.4.1	$\alpha$ -amilase	53
5.2.4.2	Protease	56
5.2.4.3	Lipase	58
<b>5.2.5</b>	<b>Grau de Intumescimento dos Hidrogéis</b>	<b>60</b>
<b>5.2.6</b>	<b>Perfil de Intumescimento dos Hidrogéis</b>	<b>63</b>
<b>5.2.7</b>	<b>Estudos de Liberação da Pancreatina</b>	<b>65</b>
5.2.7.1	Comparação entre os Hidrogéis	66
5.2.7.2	Comparação entre o Hidrogel de Alginato e o Creon <sup>®</sup>	69
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Biofármacos são medicamentos produzidos por meio da biotecnologia moderna, desde a década de 70, utilizando-se de sistemas vivos. Embora o termo esteja associado à produção de proteínas terapêuticas por meio da tecnologia do ácido desoxirribonucleico - DNA recombinante, conforme Walsh (2002), anteriormente utilizava-se da biotecnologia clássica em que as proteínas terapêuticas eram extraídas de outros organismos, como por exemplo, a insulina que era extraída do pâncreas bovino ou porcino e o hormônio de crescimento que, por ser espécie-específico, era extraído da glândula pituitária de cadáveres humanos (CAREY, 1987). Como, nos dias de hoje, nem todas as proteínas utilizadas em tratamentos de reposição são produzidas por meio da tecnologia do DNA recombinante, ou ainda, não foram liberadas pela *Food and Drug Administration* - FDA, estas continuam sendo obtidas, tradicionalmente, por meio da biotecnologia clássica. Com isso, o termo biofármacos compreende as substâncias obtidas de órgãos, tecidos e fluidos de origem animal, vegetal, micro-organismos, ou ainda, a partir de células e micro-organismos modificados geneticamente conforme Carreira et al. (2013), utilizadas com finalidades profiláticas, curativas, paliativas ou para fins de diagnóstico (BRASIL, 2010).

Dentre as vantagens, apontadas por Kiener (2009), em se utilizar biofármacos para o tratamento de doenças estão, atuação específica, mecanismos de ação e biodisponibilidade previsíveis, de modo que os efeitos colaterais sejam diminuídos quando comparados às drogas novas e de atuação não específica, uma vez que são idênticos ou muito similares às proteínas humanas (CARREIRA, et al., 2013).

Neste trabalho o biofármaco de estudo é a pancreatina, um complexo enzimático, produzido no pâncreas, responsável por grande parte do metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos. Por anos, a pancreatina vem sendo utilizada com o objetivo de melhorar a absorção desses nutrientes, uma vez que a deficiência destes pode desencadear patologias como, a fibrose cística e pancreatite crônica, dentre outras, segundo FDA (2006), sendo que em casos de crianças portadoras da insuficiência de enzimas pancreáticas, a má absorção dos nutrientes pode levar até a morte (VENKATWSH et al., 2014).

De acordo com Reis et al. (2006) a utilização dessas moléculas é restrita à algumas formas de administração decorrentes da baixa estabilidade pela presença de enzimas proteolíticas e pH's capazes de degradá-las, diminuindo a meia-vida e a biodisponibilidade destas. Jorgensen et al. (2006) confirma a dificuldade em disponibilizar macromoléculas por

via oral devido à instabilidade destas no trato gastrointestinal. Porém, como esta é a via de administração de fármacos melhor aceita pelos pacientes fez-se necessário o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos que fossem capazes de proporcionar maior estabilidade às macromoléculas empregadas nas terapias de reposição. Por isso, de acordo com Deyoung (1989), no mercado encontram-se disponíveis diferentes formas farmacêuticas contendo pancreatina, como por exemplo, comprimidos revestidos, cápsulas gastroresistentes e cápsulas com microesferas revestidas, que têm sido desenvolvidas com o objetivo de melhorar a eficácia deste biofármaco, protegendo-o, do meio ácido gástrico responsável pela sua inativação (WALLACE; SHARKEY, 2011).

Os sistemas de liberação de drogas têm como função liberar o fármaco em um determinado local de ação (ALLEN JR.; POPOVICH; ANSEL, 2007). Conforme Fernandes; Filgueira (2008), dispositivos como nano e micropartículas, lipossomas, cristais líquidos e os hidrogéis são sistemas de liberação capazes de contribuir com a estabilidade, solubilidade, farmacocinética e biodistribuição dos fármacos incorporados. Além disso, os hidrogéis tem se apresentado como potentes sistemas carreadores de fármacos (GRAHAM, 1990), biocompatíveis e biodegradáveis, e ainda, a capacidade de intumescimento em água e fluidos biológicos, características que tem despertado interesses do setor farmacêutico (ROKHADE et al., 2007). Algumas classes de medicamentos já se utilizam dos hidrogéis como dispositivo de liberação modificada como, por exemplo, anti-hipertensivos (SILVA, 2006), hipoglicemiantes (NAKAMURA et al., 2004), antibacterianos (VILAMA et al., 2009), oftálmicos. Segundo Kumar (2000), micro e nanopartículas formadas por polímeros tem sido amplamente utilizadas como veículos de fármacos, por permitirem transportes mais eficientes, melhorando a liberação nos locais de ação.

Na tentativa de melhorar a eficácia do tratamento de indivíduos portadores de insuficiência de enzimas pancreáticas, este trabalho tem como intuito obter um material capaz de preservar a atividade da pancreatina do fluido gástrico simulado e liberar as enzimas em fluido intestinal simulado (de pH compatível ao local de ação), por meio da encapsulação deste biofármaco utilizando-se de hidrogéis naturais.

Os produtos disponíveis no mercado não apresentam nenhuma formulação que se utilize de hidrogéis oriundos de biopolímero naturais como carreadores capazes de preservar a atividade enzimática da pancreatina, por meio da encapsulação desta. Na literatura, alguns estudos apresentam a encapsulação das enzimas separadamente, porém, geralmente estas enzimas são obtidas de micro-organismos, o que difere da proposta apresentada neste trabalho,

que é de tentar encapsular o complexo enzimático extraído do pâncreas de porco, pancreatina aprovada pelo FDA.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura apresenta informações sobre as aplicações da pancreatina no âmbito farmacêutico, bem como possíveis estratégias utilizadas a fim melhorar sua estabilidade e eficiência. O enfoque é dado ao encapsulamento das enzimas por meio da utilização de hidrogéis de polímeros naturais com caráter aniônico.

### 2.1 A PANCREATINA ENQUANTO BIOFÁRMACO

De acordo com FDA (2006), a pancreatina é uma enzima pancreática extraída do pâncreas porcino ou bovino, composta por três enzimas principais: amilase, protease (tripsina, quimiotripsina e carboxipeptidase A) e lipase. Dentre elas, a lipase é a enzima de maior importância contida neste complexo, uma vez que no organismo a lipase pancreática é responsável pela hidrólise de aproximadamente 70% dos lipídios ingeridos (WALLACE; SHARKEY, 2011).

Ainda, de acordo com FDA (2004), a pancreatina extraída de origem animal é um biofármaco, utilizado no tratamento de indivíduos com insuficiência pancreática exócrina, que é capaz de desencadear problemas como: a má absorção de nutrientes, que pode resultar em retardo do crescimento e do desenvolvimento, prejuízo da resposta imunológica, infecções, tendência a hemorragias, como também, fibrose cística e pancreatite crônica, dentre outras (WALLACE; SHARKEY, 2011).

Embora, formulações contendo pancreatina venham sendo utilizadas, há anos, na suplementação das enzimas pancreáticas, a eficácia e segurança desses agentes ainda não foram esclarecidas. Somente em 2004, o FDA relatou a existência de formulações comerciais com diferentes composições, atividades enzimáticas, estabilidade e biodisponibilidade capazes de afetar o desempenho terapêutico e estabeleceu a necessidade de se registrar esses biomedicamentos (FDA, 2004).

A *United States Pharmacopeia* - USP 32 (2009) determina que comprimidos e cápsulas são constituídos por um mínimo de 90,0% de pancreatina, de forma que cada mg de pancreatina é constituído por, aproximadamente 25 unidades USP de atividade de amilase, a partir de

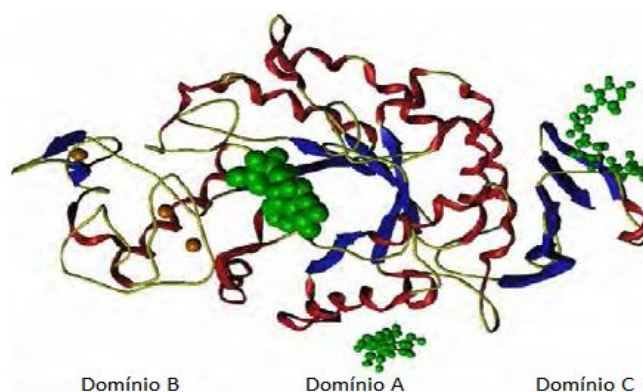
2,0 unidades USP de atividade de lipase e 25 unidades USP de atividade de protease, e ainda define, USP como a unidade de atividade enzimática.

Conforme FDA, apenas 6 medicamentos/suplementos contendo pancreatina foram regulamentados, tais como Creon<sup>®</sup>, Pancreaze<sup>®</sup>, Pertzye<sup>®</sup>, Ultresa<sup>®</sup>, Zenpep<sup>®</sup>, que são apresentados como cápsulas de liberação retardada, e Viokace<sup>®</sup>, apresentado em forma de comprimido revestido, sendo que alguns desses possuem variações nas atividades enzimáticas (FDA, 2004). Portanto, considerando as formulações disponíveis, ainda não há no mercado um medicamento/suplemento contendo pancreatina com liberação modificada por meio de hidrogéis.

### 2.1.1 $\alpha$ -amilase

A  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1.- número de comissão de enzimas) secretada pelo pâncreas e tem como função hidrolisar ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas de amido, glicogênio, dentre outros carboidratos, resultando em oligossacarídeos de diversos tamanhos, como amilose, maltotriose, maltose, etc, para que o organismo seja capaz de absorver esses nutrientes, agora, de menor tamanho (LOTTERMANN, 2012). Esta enzima é uma proteína monomérica formada por aproximadamente, 500 aminoácidos, peso molecular em torno de 50 kDa. Apresenta atividade ótima em pH 7,5 e possui 3 domínios em sua estrutura, sendo que seu sítio ativo está localizado entre os domínios A e B (FIGURA 1). Esta é uma proteína dependente de  $\text{Ca}^{+2}$ , que por sua vez, é responsável por conferir estabilidade as estruturas terciárias e secundárias da molécula, e ainda, funciona como ativador alostérico (WHITCOMB; LOWE, 2013).

Figura 1 – Representação da estrutura da  $\alpha$ -amilase.



Fonte: Adaptado de LOTTERMANN (2012).

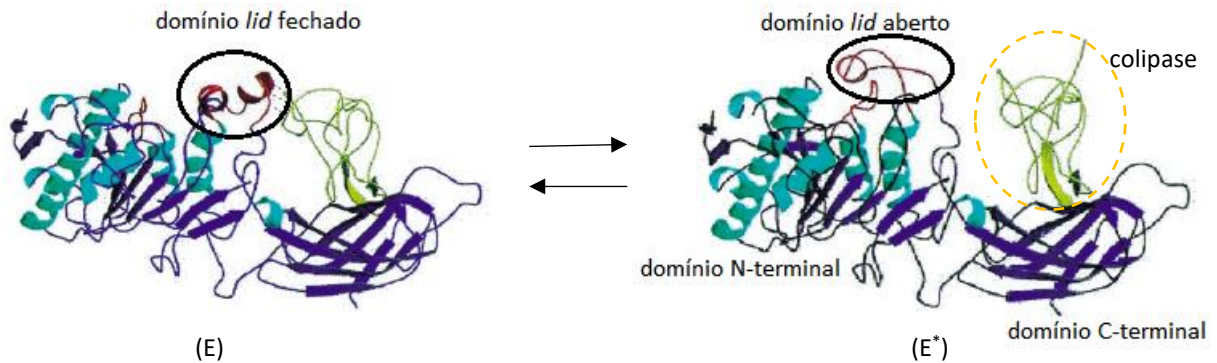
### 2.1.2 Protease

Proteases são enzimas responsáveis pela clivagem de ligações peptídicas de substratos proteicos (EDGINGTON; VERDOES; BOGYO, 2011). Também são conhecidas como peptidases, podendo ser classificadas em endopeptidases (EC 3.4.11.19) quando iniciam o processo de clivagem pelas regiões N-terminal ou C-terminal das proteínas, formando pequenos peptídeos ou aminoácidos, e exopeptidases (EC 3.4.21.49), sendo que quando clivam as ligações peptídicas próximas ao grupamento N-terminal, são denominadas aminopeptidases, e quando clivam as ligações peptídicas próximas ao grupamento C-terminal, são denominadas carboxipeptidase (RAO et al., 1998). Além disso, as proteases podem também ser classificadas com base nos mecanismos catalíticos (BARRETT; RAWLINGS; WOESSNER, 2004). O tripsinogênio, quimotripsinogênio e carboxipeptidases fazem parte das proteases produzidas pelo pâncreas, sendo as duas primeiras produzidas em suas formas inativas. O tripsinogênio é produzido no pâncreas e convertido em tripsina quando chega ao duodeno devido à ação da enteroquinase presente no suco gástrico. A tripsina apresenta como tríade catalítica *His, Asp, Ser*, e por sua vez, tem como função transformar o quimotripsinogênio em quimiotripsina capaz de clivar o substrato depois de resíduos aromáticos (RUHLMANN et al., 1973). A clivagem depende da ligação dos resíduos de aminoácidos do substrato aos subsítios da enzima ativa.

### 2.1.3 Lipase

A lipase pancreática é responsável por 70% da atividade lipolítica do organismo e é secretada já na sua forma ativa. Esta foi a primeira enzima lipolítica a ter sua estrutura conhecida, apresenta peso molecular de 50 kDa, 449 aminoácidos e é formada por dois domínios: N-terminal e C-terminal (FIGURA 2). O domínio N-terminal tem o sítio ativo formado pela tríade catalítica *Ser, Asp, His*. O *lid* é uma parte da estrutura da molécula da lipase que cobre o sítio ativo, quando a estrutura está em sua conformação fechada, e tem como função permitir o acesso do substrato ao sítio ativo. A presença de sais biliares pode interferir na interação enzima-substrato, com isso a lipase se complexa à colipase que facilita essa interação (TILBEURGH et al., 1992).

Figura 2 – Representação das estruturas do complexo lipase pancreática-colipase em conformação fechada (E) e conformação aberta (E\*).



Fonte: Adaptado de TILBEURGH et al. (1992).

A seguir serão apresentadas algumas estratégias que auxiliam na melhoria da estabilidade, e conseqüentemente, na eficiência das enzimas pancreáticas em diferentes formas farmacêuticas.

## 2.2 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS EMPREGADOS NAS FORMULAÇÕES DISPONÍVEIS COMERCIALMENTE

Todos os suplementos, que contém pancreatina, se apresentam como formas farmacêuticas de administração por via oral, o que implica na passagem pelo estômago, local extremamente ácido, segundo Thoma e Bechtold (1999), e ainda, Wallace e Sharkey (2011), o que é capaz de comprometer a atividade enzimática parcial ou totalmente, de acordo com Lennernäs e Abrahamsson (2007), antes que estas alcancem o local de ação que é o intestino. Por isso, não adianta haver liberação de grandes quantidades de enzima se o pH do local de liberação é capaz de inativá-las (ALOULOU et al., 2007; GUARNER et al., 1993).

Com isso, surgiu a necessidade de buscar novas estratégias que fossem capazes de proporcionar maior estabilidade e eficiência enzimática, como os sistemas de liberação de fármacos. Constituem esse sistema: os lipossomas, as bombas osmóticas, os sistemas transdérmicos, os pró-fármacos, os sistemas matriciais poliméricos e os revestimentos entéricos (LOPES; LOBO E COSTA, 2005). Metodologias que tem sido, amplamente, empregada na proteção de proteínas do meio gástrico e liberação em meio intestinal são o revestimento e a encapsulação utilizando-se de materiais entéricos (THIMMA; TAMMISHETTI, 2001).

### 2.2.1 Revestimento entérico: principal estratégia empregada pela indústria farmacêutica

Revestimentos entéricos são excipientes aplicados sobre a superfície de formas farmacêuticas orais, como comprimidos, cápsulas e microesferas. Este tipo de revestimento tem como função impedir a liberação do ativo em meio ácido, devido à alguma incompatibilidade apresentada entre ativo e meio que seja capaz de comprometer sua ação, e permitir a liberação apenas em meio básico, sendo então responsável por uma liberação retardada do ativo (BRASIL, 2010).

A necessidade de introduzir um revestimento entérico foi elucidada quando percebeu-se que apenas uma pequena porção dessas enzimas era capaz de se manter íntegra após passar pelo meio gástrico (ALLOULOU et al., 2007; DIMAGNO et al., 1977;). Isso porque em meio ácido e presença de pepsina, grande parte das enzimas, principalmente as lipases, podem ser, irreversivelmente, inativadas com uma significativa perda da atividade biológica (VENKATWSH et al., 2014).

Alguns estudos relatam que a eficiência de microesferas com revestimento entérico se sobressai em relação à comprimidos revestidos, uma vez que o menor tamanho permite que estas se misturem aos alimentos com maior facilidade, de acordo com Aloulou et al. (2007) e Stead et al. (1987), e por apresentarem maior superfície de contato proporcionam maior homogeneidade, tanto da dissolução do revestimento quanto da liberação enzimática. O pH na região do duodeno é outro fator de grande importância para determinar a velocidade de liberação das enzimas contidas em microesferas com revestimento entérico. Isso porque, o pH duodenal de indivíduos saudáveis apresenta-se próximo de 5,0 após uma refeição, e em seguida, este retorna para o pH de jejum, aproximadamente 6,0 (CARRIERE et al., 2005; DIMAGNO, 2001). Porém, pacientes que possuem distúrbios pancreáticos apresentam pH duodenal menores, devido à redução de produção e liberação de bicarbonato, conforme Kopelman et al. (1988), e ainda, aumento do fluido gástrico (CARRIERE et al., 2005). Logo, microesferas pancreatina devem chegar ao duodeno e jejuno dispersas no quimo e a dissolução dos revestimentos destas deve ocorrer prontamente, numa faixa de pH entre 5,0 e 5,5 para que a liberação da pancreatina ocorra rapidamente (VENKATWSH et al., 2014).

De acordo com a metodologia geral do teste de dissolução presente na Farmacopéia Brasileira (2010) e a *United States Pharmacopoeia* – USP 32 (2009), uma forma farmacêutica de liberação retardada, deve ser capaz de preservar o ativo em meio ácido por 2 h e liberá-lo no meio intestinal, em no máximo 45 min. Logo, revestimentos que demoram mais de uma hora

para se solubilizarem e liberar as enzimas resultam em sistemas ineficientes, uma vez que a liberação ocorrerá no final do intestino delgado, de forma que não haverá tempo hábil para absorção dos produtos gerados (ALOULOU et al., 2007; GUARNER et al., 1993).

### **2.2.2 Encapsulação por meio de materiais entéricos**

A encapsulação de biofármacos de natureza proteica é uma ferramenta utilizada para estabilizar e reduzir a inativação das proteínas, seja por distorção estrutural, influência de temperatura ou pH e interação com solventes orgânicos, segundo Hanefeld, Gardossi e Magner (2009), e ainda, Thimma e Tammishetti (2001), daí a importância de se promover um confinamento de enzimas, e conseqüentemente, aumentar a vida útil destas (GUPTA, 1991). Por se utilizar de técnicas simples e de baixo custo, e ainda, ser capaz de promover o confinamento a temperaturas próximas à ambiente, permitindo o controle da porosidade da matriz e maior estabilidade mecânica, vem chamando atenção do setor farmacêutico (GILL, 2001).

O processo de encapsulação de agentes terapêuticos pode ocorrer de duas maneiras distintas. A primeira é a encapsulação durante a formação do hidrogel, em que o fármaco é adicionado à solução polimérica promovendo a retenção deste durante o processo de reticulação da matriz conforme Bhattarai, Gunn e Hang (2010), proporcionando uma liberação moderada do material encapsulado, o que pode resultar num aprisionamento permanente, e conseqüentemente, numa liberação incompleta (JAYAKUMAR, 2010). A outra forma de encapsulação ocorre depois que a matriz do hidrogel já foi formada, com isso a incorporação do fármaco acontece por meio da difusão deste para o interior da matriz polimérica, ao submeter o hidrogel formado à uma solução saturada do fármaco de interesse por um tempo adequado. Este segundo método é capaz de promover uma liberação do fármaco de forma mais imediata (BHATTARAI; GUN; ZHANG, 2010).

Porém, algumas desvantagens devem ser destacadas como, por exemplo, a possível inativação destas biomoléculas durante o procedimento de encapsulação, a alta concentração destes agentes necessária para garantir a encapsulação, e ainda, os possíveis efeitos de difusão (DE CASTRO et al., 2008; HANEFELD; GARDOSSEI; MAGNER, 2009). A porosidade da matriz polimérica é um fator determinante no tempo de retenção e de liberação de moléculas bioativas, assim como o pH, que está diretamente ligado à solubilidade, liberação, estabilidade

e compatibilidade (FERREIRA, 2002). A escolha do polímero que irá funcionar como veículo é de fundamental importância, uma vez que este será responsável pelo aumento do tempo de meia-vida do biofármaco encapsulado, no entanto, uma má escolha pode comprometer não só a estabilidade térmica, mas o desempenho global do sistema (MENDES et al., 2011).

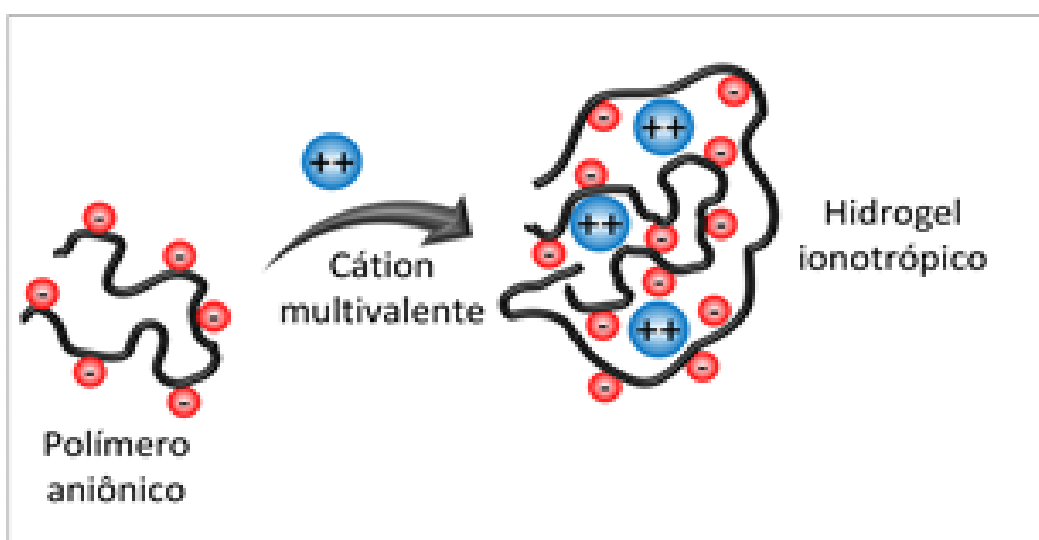
### 2.2.2.1 Hidrogéis

O interesse por hidrogéis, conhecidos como sistemas inteligentes, tem chamado a atenção da indústria farmacêutica, por apresentarem diferentes comportamentos diante de variações de temperatura e pH, e com isso promover uma liberação modificada de fármacos, uma vez que as matrizes hidrofílicas podem ser carregadas com uma solução contendo o princípio ativo (HOFFMAN, 2002; QIU; PARK, 2012; SCHOENER; PEPPAS, 2013).

Apresentam-se como matrizes hidrofílicas verdadeiras ou colóides hidrofílicos e em meio aquoso formam estruturas poliméricas tridimensionais por meio de ligações de natureza física (como pontes de hidrogênio e forças de *Van der Waals*) ou química (reações), responsáveis por dar forma, determinar a reticulação, e conseqüentemente, a mobilidade das cadeias poliméricas (COLLETT; MORETON, 2005). O tipo de ligação que ocorre entre as cadeias poliméricas determina se os hidrogéis formados são químicos ou físicos. A formação de hidrogel por meio de ligação covalente, o classifica como hidrogel químico, enquanto ligações do tipo pontes de hidrogênio, ligações iônicas ou interações hidrofóbicas, o classificam como hidrogel físico, uma vez que essas ligações são consideradas reversíveis (COIMBRA, 2010). Interações iônicas entre agentes reticulantes carregados positivamente e polímeros carregados negativamente levam à formação de hidrogéis ionotrópicos (figura 3), processo considerado simples e que não necessita de agentes catalisadores, quando comparado à reticulação por meio de interações covalentes (PEPAS, 1986; RANA et al., 2011). Como agentes catalisadores apresentam toxicidade ao organismo, como por exemplo o glutaraldeído, a utilização de hidrogéis ionotrópicos tem se destacado, devido à maior segurança proporcionada por sistemas obtidos em meios totalmente aquosos (RANA et al., 2011). Embora Coimbra (2010) considere como desvantagem o fato de que os hidrogéis físicos apresentem propriedades mecânicas fracas, devido sua formação ocorrer por meio de ligações reversíveis e facilitar a degradação, essa característica pode ser promissora na aplicação destes em sistemas

de liberação de fármacos. Vários fatores influenciam na liberação do fármaco encapsulado, como por exemplo, as propriedades físico-químicas do fármaco e do polímero, o meio de liberação, e ainda, a interação que ocorre entre fármaco, polímero e meio. Daí a importância de se analisar o grau de reticulação da rede polimérica, tamanho dos poros, morfologia, capacidade de intumescimento, degradação da matriz polimérica e o melhor método para encapsulação do ativo (COIMBRA, 2010).

Figura 3 – Representação da formação de hidrogéis físicos ionotrópicos por meio de polímero aniônico.



Fonte: HOFFMAN (2002).

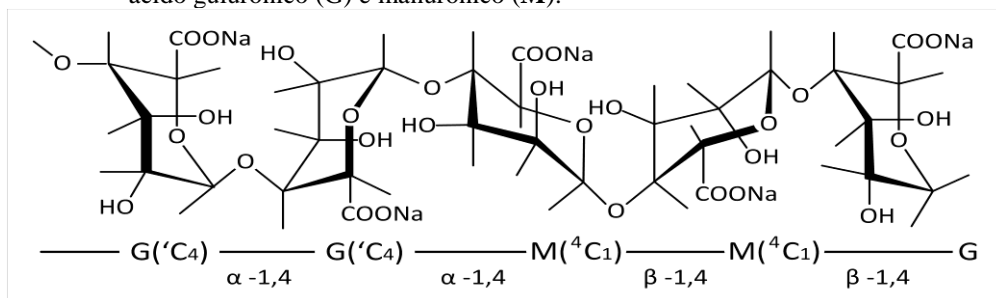
#### 2.2.2.1.1 Biopolímeros

Os polímeros naturais hidrofílicos, como os polissacarídeos, têm sido amplamente utilizados com a finalidade de promover a liberação modificada de fármacos e apresentam como vantagens a biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade e baixo custo (LORENZO et al., 2013). Biopolímeros que apresentam a capacidade de alterar o intumescimento de acordo com as condições do meio em que estão submetidos foram selecionados para o desenvolvimento deste trabalho: o alginato, a  $\kappa$ -carragenana e a pectina, todos polímeros naturais classificados como polissacarídeos de caráter aniônico.

O alginato de sódio é um dos polímeros naturais mais utilizados por apresentar baixo custo, fácil obtenção, ser biocompatível e biodegradável, não ser tóxico ao organismo, e ainda, não precisa de solventes orgânicos para sua formação, podendo ser obtido a baixas temperaturas

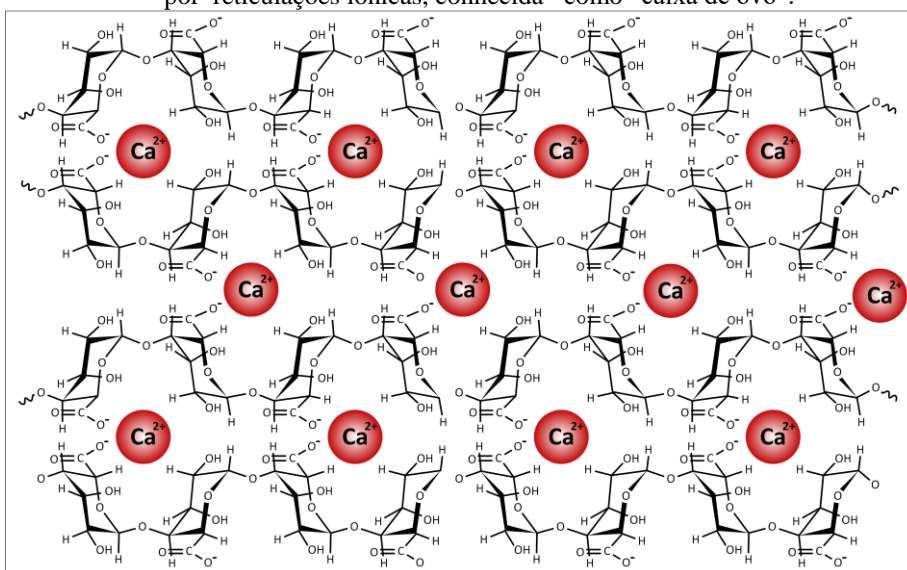
sendo o hidrogel formado pelo processo de gelificação ionotrópica (FUNDUEANU et al., 1998; SCHOUBBEN et al., 2010). Este polissacarídeo é extraído de algas marrons, com estrutura química formada por um polímero linear constituído por unidades de ácidos L-gulurônico e D-manurônico (GEORGE; ABRAHAM, 2006; TAPIA et al., 2004) (FIGURA 4). Apresenta boa solubilidade em água, mas na presença de íons divalentes, estes reagem com seus grupamentos carboxílicos formando reticulações iônicas, que resultam num gel com estrutura de caixa de ovo conforme Dini, Islan e Castro (2014) (figura 5), e ainda, de boa estabilidade (HAN et al., 2007). O hidrogel de alginato de cálcio é um dos mais reportados na literatura, sendo muito empregado na encapsulação de macromoléculas, a fim de proporcionar um ambiente capaz de manter a integridade destas (SCHOUBBEN et al., 2010). Em geral, esse material proporciona liberação rápida do material encapsulado (HAN et al., 2007).

Figura 4 – Representação da estrutura do alginato de sódio, formado por várias unidades de ácido gulurônico (G) e manurônico (M).



Fonte: OTSUKA; NAGASAKI; KATAOKA (2000).

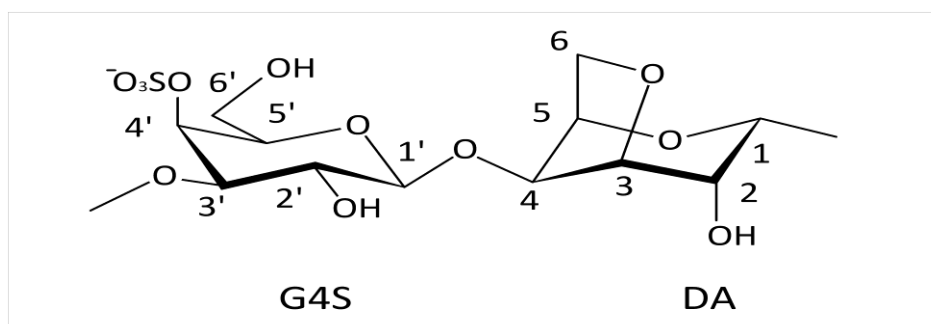
Figura 5 – Representação da estrutura do hidrogel de alginato-Ca formado por reticulações iônicas, conhecida como “caixa de ovo”.



Fonte: KIM et al. (2008).

As carragenanas vem sendo empregadas em diversos setores, como por exemplo, alimentício, farmacêutico, cosmético, etc (IMESON, 2000). Por apresentar boa compatibilidade com outros excipientes, robustez e alta viscoelasticidade, tem sido utilizada na compressão de comprimidos, e ainda, na liberação controlada de fármacos (BHARDWAJ et al., 2000). A  $\kappa$ -carragenana é um polissacarídeo extraído de algas marinhas vermelhas. Apresenta-se como a carragenana mais abundante e possui um grupo sulfato para cada duas unidades de galactose (FIGURA 6). Este grupo sulfato é responsável pela elevada capacidade de retenção de água (TAPIA et al., 2004).

Figura 6 – Representação estrutural da  $\kappa$ -carragenana.



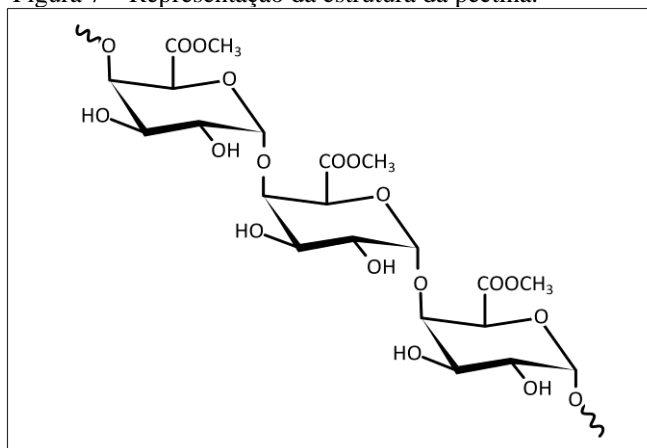
Fonte: CAMPO et al. (2009).

Segundo Pardonche (1985) a solubilidade das carragenanas em água depende de fatores como, a quantidade de grupos sulfato presentes e de sua associação à cátions, como sódio, potássio, cálcio e magnésio, responsáveis por determinar a viscosidade do gel formado. Estas apresentam-se insolúveis em solventes orgânicos, óleos e gorduras. O processo de gelificação da  $\kappa$ -carragenana ocorre em duas etapas, há uma modificação no enovelamento da hélice após o resfriamento, seguida da agregação de cátions entre as hélices. Em geral, o potássio, é o íon que proporciona melhor gelificação em concentrações menores, tanto de polímero quanto de íons (FUNAMI et al., 2007). A viscosidade da carragenana pode ser influenciada, não só pela alta concentração do polímero e presença de íons, mas também pela temperatura (ANDERSON, 1968).

As pectinas pertencem a uma família estruturalmente complexa de polissacarídeos presentes em vegetais e apresentam, em comum, resíduos de ácido D-galacturônico unidos por uma ligação  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), em sua estrutura (figura 7), porém, não há uma única estrutura bem definida, sendo consideradas estruturas mais desordenadas do que a estrutura de caixa de ovo apresentada pelo alginato. Sabe-se que durante o processamento da pectina ocorre a perda das ramificações da cadeia, por isso, normalmente, é considerada como uma cadeia linear de

resíduos de ácido D-galacturônico, em que os grupos carboxílicos encontram-se, parcialmente, esterificados com o grupo metila, podendo o grau de metoxilação variar entre 30 e 80% (BRACCINI; PÉREZ, 2001).

Figura 7 – Representação da estrutura da pectina.



Fonte: COIMBRA (2010).

Devido à propriedade de gelificação tem sido amplamente utilizada em diversas áreas como: alimentícia, cosmética, higiene pessoal e farmacêutica (ROLIN, 2002). Nesta última, vem ganhando destaque nos sistemas de liberação modificada, uma vez que este polissacarídeo é resistente ao pH estomacal e às enzimas presentes no trato gastrointestinal superior (CHOURASIA; JAIN, 2004). O processo de gelificação para formação de gel físico deve acontecer em meio ácido e na presença de íons divalentes ou de açúcares. Pectinas com altos graus de esterificação formam gel em pH's inferiores a 3,8, em presença de sólidos solúveis e concentrações acima de 55% (m/m) segundo Rolin (2002), devido à formação de pontes de hidrogênio entre os radicais carboxílicos e álcoois, ou ainda por interações hidrofóbicas entre grupos metila (RINAUDO, 2009). Porém, hidrogéis só são passíveis de formação a partir de pectinas de baixo grau de esterificação, necessitando de valores de pH maiores que 3,0 e a presença de íons di ou trivalentes, sendo que na indústria alimentícia e farmacêutica o íon mais utilizado é o cálcio. (PLASCHINA; BRAUDO; TOLSTOGUZOV, 1978; RINAUDO, 2009; ROLIN, 2002). As pectinas apresentam-se estáveis numa faixa de pH que varia de 3 a 4, sendo que em pH's inferiores elas sofrem de-esterificação e em pH's superiores sofrem despolimerização, de forma que ao associar a elevação da temperatura com valores de pH fora da faixa de estabilidade, promove um aumento da velocidade de ambas as reações (BRACCINI; PÉREZ, 2001; ROLIN, 2002). Conforme estudos realizados por Wei et al. (2006) altas concentrações de íons cálcio presentes nas formulações influenciam negativamente na taxa de

liberação do fármaco encapsulado. Alguns estudos realizados com a encapsulação da insulina em pectinatos de cálcio revelaram que a liberação do bioativo ocorreu bem antes de chegar ao cólon, diferentemente do que era esperado (RUBINSTEIN; RADAI, 1995).

### 2.3 CREON®: FORMULAÇÃO COMERCIALMENTE DISPONÍVEL UTILIZADA COMO MODELO

De acordo com informações fornecidas pelo fabricante do Creon® 10.000, *Abbott Laboratories GmbH*, este suplemento possui 10.000 unidades de atividade enzimática de lipase, 33.200 unidades de atividade enzimática de amilase e 37.500 unidades de atividade enzimática de protease, conforme a *United States Pharmacopoeia*. Na formulação do Creon® estão presentes inúmeros excipientes, apresentados no quadro 1. O medicamento se apresenta como cápsulas contendo minimicroesferas de pancreatina revestidas (figura 8), a fim de promover uma proteção das enzimas presentes na formulação, em meio gástrico, e liberá-las apenas em meio intestinal, em pH superiores a 5,5, como descrito pelo fabricante.

Quadro 1 – Excipientes presentes na formulação do Creon® 10.000.

<b>EXCIPIENTES</b>	<b>FUNÇÕES</b>
<b>Macrogol</b>	Agente solubilizante, estabilizante, surfactante não iônico, intensificador de dissolução
<b>Ftalato de hipromelose</b>	Agente de revestimento
<b>Álcool cetílico</b>	Agente de revestimento, emulsificante e de endurecimento
<b>Citrato de trietila</b>	Agente plastificante, solvente
<b>Dimeticona</b>	Agente anti-espuma, emoliente e hidrofóbico
<b>Gelatina</b>	Agente de revestimento, formador de filme, gelificante, de suspensão, aglutinante, doador de viscosidade
<b>Óxido de ferro anidro (III), óxido de ferro hidratado (III), óxido de ferro (II, III)</b>	Agente corante
<b>Dióxido de titânio</b>	Agente de revestimento, opacificante e corante
<b>Laurilsulfato de sódio</b>	Agente lubrificante

Fonte: Adequado de ROWE; SHESKEY; QUINN (2009).

Nota: Quadro construído com base nas informações de *Abbott Laboratories GmbH*, sobre a composição da formulação do Creon® 10.000.

Figura 8 – Embalagem externa do Creon® 10.000 e cápsulas contendo minimicroesferas revestidas.



Fonte: Do autor.

Nota: Imagens obtidas da embalagem externa do Creon® 10.000 e suas respectivas cápsulas, ampliadas, contendo minimicroesferas revestidas.

### 3 OBJETIVOS

A seguir serão descritos os objetivos gerais e específicos que nortearam esse trabalho.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Preparar um material capaz de preservar atividade da pancreatina do contato como meio ácido, e ainda, liberá-la em pH similar ao seu local de ação, a fim de obter eficiência compatível ou de melhor desempenho quando comparado à um produto disponível comercialmente, que se apresenta como minimicroesferas revestidas gastroresistentes, o Creon®.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Preparar esferas de hidrogéis contendo pancreatina, a partir de diferentes polímeros naturais.
- b) Caracterizar os materiais obtidos por meio de análise termogravimétrica, infravermelho, grau de intumescimento e perfil de intumescimento.
- c) Analisar a liberação do biofármaco dos diferentes hidrogéis preparados, tanto no pH estomacal quanto no pH intestinal, simulados.
- d) Comparar a liberação de pancreatina do hidrogel de melhores resultados com a liberação enzimática de uma formulação disponível comercialmente, o Creon®, quando submetidos às mesmas condições.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir serão apresentados os materiais, equipamentos e acessórios, e ainda, os métodos empregados para a realização deste trabalho.

### 4.1 MATERIAIS

Pancreatina 8 x USP (P7545) adquirida da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Esta é uma formulação de enzima em pó com atividades de lipase, protease e amilase de 16 U/mg, 200 U/mg e 200 U/mg de sólido (informação técnica da Sigma-Aldrich). O sal de sódio de ácido algínico (massa molecular: 120.000-190.000 g/mol e proporção de ácido manurônico para ácido gulurônico de 1.56),  $\kappa$ -carragenana e pectina (grau de metilação de 30% e massa molecular de 60.000-90.000 g / mol) adquiridos de Sigma-Aldrich, Walmon Commercial (São Paulo, SP) e CPKelco (Limeira SP, Brasil), respectivamente. A Creon<sup>®</sup> 10.000 (10.000 U lipase, 33.200 U a-amilase e 37.500 U protease) adquirido da Abbott Laboratories GmbH (São Paulo, SP). Azocaseína, ácido 3,5-dinitrosalicílico, palmitato de p-nitrofenol e tartarato de sódio e potássio adquiridos da Sigma Aldrich, azeite de oliva (baixa acidez, Carbonell) comprado no Supermercado São Paulo em Alfenas-MG, ácido tricloroacético, glicose, amido solúvel, fenol, etanol, acetona, isopropanol, fenolftaleína foram adquiridos da Synth<sup>®</sup> e metabissulfito de sódio, hidróxido de sódio, dodecil sulfato de sódio foram adquiridos da Vetec Química. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 4.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Centrífuga (Centribio), espectrômetro de infravermelho NicolettiS50 FTIR (*ThermoScientific, USA*) acoplado a PikeGladiATRTechnologies, termobalança (modelo TG/DTA7300, SII Nano Technology, Japan), espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV1800), balança analítica (AY220 Shimadzu), microscópio eletrônico Hitachi Analytical Table Top (*Tarrytown, NY, USA*) modelo TM3000, shaker orbital com aquecimento (Marconi), agitador

magnético (Fisatom - mod.751), agitador magnético com aquecimento (Nova Ética – mod.114), pipetador automático, micropipetas, banho termostático (Cientec – mod. CT226), pHmetro (MS Tecnopon instrumentação – mPA210), bomba à vácuo (Cientec – mod. 618), cadinhos de alumínio, cubetas de vidro de 1 cm de caminho ótico, vidrarias, seringas, agulhas, placas de petri, papel absorvente, geladeira, eppendorfs, computador.

#### 4.3 PREPARO DOS HIDROGÉIS

Inicialmente, os hidrogéis foram preparados a partir de uma solução polimérica submetida a banho de glicerina de aproximadamente 60 °C, até total solubilização. Esta solução foi resfriada a temperatura ambiente e vertida em uma bureta. Em um béquer foi colocada uma solução salina com uma carga conhecida de pancreatina, sob agitação, em que foi gotejada a solução presente na bureta. Após a formação das esferas de hidrogéis, estes permaneceram sob agitação por 30 min. Os hidrogéis obtidos foram separados da solução salina por meio de uma bomba de filtração a vácuo, e posteriormente, transferidos para placas de Petri para secagem em geladeira a 4 °C, até obtenção de massa constante. Foram preparados hidrogéis controle em que a solução salina não possuía carga enzimática. Para isso foi necessário realizar um estudo das concentrações das soluções poliméricas e respectivas soluções salinas a serem empregadas no preparo dos hidrogéis, apresentado na tabela 1.

Tabela 1 – Estudo das concentrações de soluções poliméricas e salinas empregadas no preparo dos hidrogéis de alginato e carragenana, em meio aquoso.

	<b>Concentração das soluções % (m/v)</b>				
<b>Solução polimérica de alginato</b>	0,5	1,5	2,5	-	-
<b>Solução salina de CaCl<sub>2</sub></b>	2,0	2,0	2,0	-	-
<b>Solução polimérica de carragenana</b>	1,5	1,5	1,5	2,0	2,2
<b>Solução salina de KCl</b>	0,55	0,75	1,5	1,5	1,2

Fonte: Do autor.

Devido à problemas detectados no preparo dos hidrogéis a metodologia empregada foi modificada. Para isso, tanto as soluções poliméricas quanto as soluções enzimáticas foram preparadas em meio tamponado e um novo estudo das concentrações poliméricas e salinas foi realizado, como apresentado da tabela 2. Todos os hidrogéis foram preparados em triplicata.

Tabela 2 – Estudo das concentrações de soluções poliméricas e salinas empregadas no preparo dos hidrogéis em meio tamponado.

	Concentração das soluções % (m/v)		
<b>Solução polimérica de alginato</b>	1,5	3,0*	-
<b>Solução salina de CaCl<sub>2</sub></b>	0,375	0,75*	-
<b>Solução polimérica de carragenana</b>	2,0	1,75*	-
<b>Solução salina de KCl</b>	1,5	4,5*	-
<b>Solução polimérica de pectina</b>	1,5	1,5	3,0*
<b>Solução salina de CaCl<sub>2</sub></b>	0,375	0,5	0,75*

Fonte: Do autor.

Nota: Concentrações de solução polimérica e solução salina empregadas no preparo do hidrogel, descrito e caracterizado.

O preparo dos hidrogéis de alginato e pectina foi realizado com base nos estudos de Bhushan, Parshad e Qazi (2008) e Dini, Islan e Castro (2014), respectivamente. As soluções poliméricas foram preparadas a partir de 25,00 mL de uma solução do biopolímero a 6% (m/v) em tampão 50 mM Tris/HCl pH 7,5, incubado em banho de glicerina a 60 °C sob agitação, até completa solubilização. Em seguida, as soluções foram resfriadas até temperatura ambiente. Uma solução enzimática foi preparada pela da adição de 0,5 g de pancreatina em 25,00 mL de tampão 50 mM Tris/HCl pH 7,5, agitada em vórtex por 10 min e centrifugada por 30 min. Homogeneizou-se a solução de biopolímero com a solução enzimática (obtendo volume total de 50,00 mL), transferiu-se essa mistura para uma seringa (20,00 mL) que foi utilizada para formação dos hidrogéis carregados por meio do gotejamento das soluções poliméricas carregadas em 50,00 mL de solução aquosa de CaCl<sub>2</sub> 0,75% (m/v), sob agitação. Após 30 min em contato com a solução salina, ainda sob agitação, as esferas foram drenadas por meio de um funil de Büchner sob vácuo, e posteriormente, secas em geladeira, até obtenção de massa constante (período de aproximadamente duas semanas). Para obtenção dos hidrogéis controle, a solução enzimática foi substituída por solução tampão 50 mM Tris/HCl pH 7,5. Tanto para os hidrogéis controles quanto carregados, foram utilizados 49,00 mL de soluções poliméricas (controle ou carregada) e após a drenagem dos hidrogéis foram obtidos 49,00 mL de solução salina.

Quanto ao preparo do hidrogel de carragenana, o procedimento adotado foi baseado num trabalho realizado com a encapsulação de azul de metileno, por meio da  $\kappa$ -carragenana, que demonstrou que a eficiência de encapsulação dobrava com o aumento da concentração de

polímero de 1 para 4% (m/v) (DANIEL-DA-SILVA et al., 2011). Uma solução de carragenana foi preparada a partir de 25,00 mL de uma solução do biopolímero a 3,5% (m/v) em tampão 50 mM Tris/HCl pH 7,5, incubado em banho de glicerina a 60 °C sob agitação, até completa solubilização. A solução foi resfriada até 40 °C. Uma solução enzimática foi preparada pela adição de 0,5 g de pancreatina em 25,00 mL de tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,5, agitada em vórtex por 10 min e centrifugada por 30 min. Misturou-se a solução de biopolímero com 25,00 mL de tampão 50 mM Tris/HCl pH 7,5, para produzir o hidrogel controle (sem a enzima), e ainda, misturou-se 25,00 mL da solução do biopolímero a 25,00 mL de solução enzimática, para produzir o hidrogel carregado. Ambas as porções foram transferidas uma para cada seringa. As esferas de hidrogel foram formadas por meio do gotejamento das soluções contidas nas seringas, sendo que para cada seringa foram utilizados 50,00 mL de solução aquosa de KCl 4,5% (m/v), sob agitação. Após 30 min em contato com a solução salina, ainda sob agitação, as esferas foram drenadas por meio de um funil de büchner sob vácuo, e posteriormente, secas em geladeira, até obtenção de massa constante. No processo de preparação dos hidrogéis controle e carregados foram utilizados, efetivamente, 49,00 mL de solução polimérica. Após a drenagem do hidrogel controle e carregado foram obtidos 49,00 mL da solução salina.

Durante o preparo dos hidrogéis foram realizadas coletas das soluções enzimáticas preparadas e das soluções salinas obtidas ao final do processo para análises posteriores de eficiência de encapsulação. Essas amostras permaneceram em geladeira tempo suficiente para produzir todos os hidrogéis. Após a obtenção de massas constantes, devido ao processo de secagem, os hidrogéis foram pesados e as massas finais obtidas anotadas a fim de obter as atividades enzimáticas por mg de hidrogel produzido.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

A fim de caracterizar os materiais obtidos foram realizadas análise termogravimétrica, infravermelho e microscopia eletrônica de varredura dos hidrogéis controle de alginato, carragenana e pectina, e ainda, dos respectivos hidrogéis carregados com pancreatina. Também foram avaliadas a eficiência de encapsulação dos hidrogéis obtidos, analisando separadamente as atividades das enzimas presentes, assim como, o grau de intumescimento e o perfil de intumescimento destes.

#### **4.4.1 Análise Termogravimétrica**

Análise termogravimétrica foi utilizada para caracterizar os materiais obtidos com base nos estudos realizados por Martins et al. (2012). Para isso, utilizou-se uma termobalança, em que foram pesados, aproximadamente 3 mg de amostra, em cadinhos de alumínio, aquecidas a uma taxa constante de 10 °C/min, de 30 até 500 °C, sob atmosfera de nitrogênio.

A calibração do equipamento foi realizada conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (2010), sendo que a calibração da massa para o equipamento foi realizada com padrão de oxalato de cálcio monoidratado, enquanto a temperatura foi calibrada com padrão de índium metálico, numa razão de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio num fluxo de 50 mL/min, até 600 °C.

#### **4.4.3 Espectroscopia de Infravermelho**

Os espectros foram obtidos usando a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR–ATR). Os espectros foram registrados a 64 varreduras e a uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, entre os números de onda de 4000 e 400 cm<sup>-1</sup>, com base nos estudos realizados por Martins et al. (2012).

#### **4.4.4 Microscopia Eletrônica de varredura**

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas por meio de um microscópio eletrônico de marca Hitachi Analytical Table Top (*Tarrytown, NY, USA*), modelo TM3000, utilizando uma aceleração de tensão de 15 kV e aumento de 50x. Para a realização da análise as amostras foram colocadas numa fita dupla face, de carbono, porém não foi realizado nenhum tipo de tratamento prévio. Logo, as amostras foram analisadas da maneira que se apresentaram após o processo de secagem.

#### 4.4.5 Eficiência de Encapsulação dos Hidrogéis

Durante o processo de preparo dos hidrogéis, foram coletadas alíquotas de 2,00 mL da solução tampão, utilizada na preparação da solução enzimática; 2,00 mL da solução enzimática; 2,00 mL do sobrenadante obtido após a formação do hidrogel sem a enzima, e ainda, 2,00 mL do sobrenadante obtido após a formação do hidrogel contendo a enzima, que foram colocados em eppendorfs e mantidos em geladeira a fim de analisar a atividade de cada enzima e avaliar a eficiência de encapsulação de cada um dos hidrogéis obtidos. Para isso, as atividades obtidas a partir da solução enzimática, considerando o volume total de cada solução polimérica empregada no preparo de cada um dos hidrogéis foi considerada 100%. Foram ainda, obtidas atividades das enzimas que permaneceram na solução salina após o processo de preparo dos hidrogéis. Logo, a diferença das atividades obtidas nos forneceu a eficiência de encapsulação de cada uma das enzimas encapsuladas.

##### 4.4.5.1 $\alpha$ -amilase

O teste de atividade da  $\alpha$ -amilase tem como princípio a hidrólise do amido pela enzima, levando à formação de moléculas de glicose, que atuam como agentes redutores do ácido 3,5-dinitrosalicílico em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (figura 9), um reagente cromogênico, que proporciona coloração que varia do amarelo ao marrom. A reação foi parada utilizando-se de imersão em banho de gelo. A atividade amilolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de açúcares redutores por mL por min.

Figura 9 – Representação da reação de redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.



Fonte: VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO (2013).

Com base no método apresentado pela Anvisa (2012) e por Miller (1959), com algumas modificações, foi construída uma curva analítica de diferentes concentrações de glicose (a fim de obter uma faixa de trabalho de 1,85 a 22,20  $\mu\text{mol/mL}$ ) a partir de variados volumes de uma solução de glicose 1% (m/v) e variados volumes de solução tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,0, conforme mostrado na tabela 3.

Tabela 3 – Diferentes volumes de solução de glicose e de solução tampão, e ainda, as concentrações da solução de glicose empregadas na construção da curva analítica para avaliar a atividade da  $\alpha$ -amilase.

Tubo	Volume da solução de glicose 1%(m/v) ( $\mu\text{L}$ )	Volume de tampão ( $\mu\text{L}$ )	Concentração final de glicose ( $\mu\text{mol/mL}$ )
0	0	600	0
1	20	580	1,85
2	60	540	5,55
3	120	480	11,10
4	180	420	16,65
5	240	360	22,20

Fonte: Do autor.

Adicionou-se 1,50 mL de uma solução contendo ácido 3,5-dinitrosalicílico 0,74% (m/v). Os tubos foram submetidos à fervura por 5 min, e posteriormente, resfriados em banho de gelo. A cada tubo foram adicionados 15,00 mL de água destilada. A leitura espectrofotométrica foi realizada em 550 nm, utilizando uma cubeta de vidro de caminho óptico de 1 cm. A curva analítica foi construída a partir de valores obtidos em triplicata.

Para a análise das amostras, utilizou-se 300  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão 50 mM Tris/HCl pH 7,0, 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de amido solúvel 1% (m/v) e 100  $\mu\text{L}$  de amostra, para cada tubo de ensaio. A reação foi realizada em banho termostático a 37 °C durante 30 min. Adicionou-se, 1,50 mL de uma solução contendo ácido 3,5-dinitrosalicílico 0,74% (m/v). Os tubos foram submetidos à fervura por 5 minutos, e posteriormente, resfriados em banho de gelo, sendo que, a cada tubo foram adicionados 15,00 mL de água destilada. A leitura espectrofotométrica foi realizada em 550 nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. As absorvâncias (*Abs*) obtidas foram inseridas na eq.1, e posteriormente, corrigida conforme a eq.2:

$$C (\mu\text{mol.mL}^{-1}) = \frac{Abs+0,0012}{0,0281} \quad (\text{eq.1})$$

$$U.\text{mL}^{-1}.\text{min}^{-1} = \frac{C*10*fd}{30} \quad (\text{eq.2})$$

#### 4.4.4.2 Protease

O teste de atividade da protease utilizou-se de uma solução de azocaseína, um substrato cromogênico, que ao ser hidrolisado forma um produto de coloração amarelada. O reagente de parada de reação utilizado é uma solução de ácido tricloroacético, responsável por precipitar proteínas remanescentes no meio. De acordo com a metodologia apresentada pela Anvisa (2012) e Charney e Tomarelli (1947), após adequações, foi construída uma curva analítica a partir de 400 µL de tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,5, com 200 µL de uma solução de azocaseína 2% (m/v). Adicionou-se diferentes concentrações de uma solução estoque de pancreatina a 100 U/mL, a fim de se obter concentrações de 5, 10, 30, 60 e 90 U/mL. A reação ocorreu em banho termostático a 37 °C durante 15 min. Adicionou-se 1,60 mL de uma solução de ácido tricloroacético 20% (m/v) e os tubos foram centrifugados por 30 min. O sobrenadante foi recolhido para análise em triplicata usando espectrofotômetro a 400 nm em cubetas de vidro de 1 cm de caminho óptico.

Nestes testes foram utilizados 200 µL de amostra que foram submetidas ao mesmo tratamento realizado para a construção da curva analítica. Toda a análise foi realizada em triplicata. As absorbâncias (*Abs*) obtidas foram inseridas na eq.3, e posteriormente, corrigida conforme a eq.4:

$$C \text{ (U.mL}^{-1}\text{)} = \frac{Abs - 0,0202}{0,0085} \quad (\text{eq.3})$$

$$\text{U.mL}^{-1}.\text{min}^{-1} = \frac{C * 10 * fd}{15} \quad (\text{eq.4})$$

#### 4.4.4.3 Lipase

Inicialmente, a ideia foi analisar todas as enzimas por métodos espectrofotométricos, porém, devido à alguns problemas, optou-se pela utilização de um método titulométrico. Por isso, diferentes métodos para avaliar a atividade da lipase foram testados e encontram-se descritos a seguir.

#### 4.4.4.3.1 Hidrólise de palmitato de p-nitrofenila

Este método tem como princípio a análise espectrofotométrica do produto obtido a partir da reação de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (pNPP). O produto formado (p-nitrofenol) foi quantificado espectrofotometricamente a 410 nm. Inicialmente, utilizou-se 2,00 mL de tampão 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 75 µL de solução de pNPP 20 mM (solubilizado em isopropanol) e 1,00 mL de amostra. A reação ocorreu em banho termostático a 37 °C durante 15 min. Adicionou-se 1,00 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,05% (m/v), método utilizado por Terra et al. (2016).

Em seguida, testou-se o método de Kanwar et al. (2005) com adequações, em que foram utilizados: 326 µL de solução de p-NPP 20 mM, 100 µL de amostra, 2,25 mL de tampão Tris/HCl 50 mM pH 8,0. A reação ocorreu em banho termostático a 45 °C, por 20 min. Adicionou-se 1,00 mL da mistura acetona/etanol (1:1 (v/v)). As amostras foram colocadas em congelador *overnight*, centrifugadas e conduzidas para avaliação em espectrofotômetro.

#### 4.4.4.3.2 Hidrólise do azeite de oliva emulsificado

Este teste de atividade da lipase tem como princípio uma titulação direta de ácidos graxos formados a partir da hidrólise de moléculas de triacilgliceróis, provenientes do azeite, o substrato da reação, método recomendado por Soares et al. (1999) e pela USP 32 (2009), utilizado a partir de algumas adequações. O reagente de parada da reação foi uma mistura de acetona/etanol (1:1 (v/v)), a fim de precipitar a proteína. A neutralização dos ácidos graxos produzidos ocorre pelo volume conhecido de uma solução de hidróxido de sódio 30 mM, previamente padronizada. Além disso, também foram adicionadas gotas de fenolftaleína, que funciona como indicador, proporcionando a visualização do ponto de equivalência. Para a realização do teste, foi preparada uma emulsão contendo 25 g de óleo de oliva, 2,25 g de goma arábica e 75,00 mL de água destilada. Esta emulsão foi homogeneizada e mantida a 37 °C em *shaker* rotativo a 200 rpm por 20 min. Também foram colocados no shaker, os erlenmeyers a serem utilizados, a solução tampão fosfato de sódio 100 mM pH 8,0, e as amostras. Inicialmente, foi preparado um controle, a partir de 5 g de emulsão e 5,00 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 8,0. Essa mistura permaneceu no *shaker* por 5 min, e

posteriormente, foram adicionados 10,00 mL da mistura acetona/etanol. Adicionaram-se 3 gotas de fenolftaleína e titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio 30 mM. Os volumes finais obtidos foram anotados para cálculos posteriores. Para as amostras, foram colocados 5 g de emulsão, 4,90 mL de tampão e 0,10 mL de amostra. Essas misturas foram submetidas ao mesmo procedimento descrito para o controle. Os volumes finais da solução de hidróxido de sódio foram anotados para cálculos posteriores. Tanto o controle quanto as amostras foram analisados em triplicata. A atividade da lipase foi calculada pela seguinte fórmula (eq.5):

$$U/mL.min = \frac{(Vol. amostra - Vol.med.controle) * M NaOH * 1000}{(t * V amostra)} \quad (eq.5)$$

Vol. amostra = volume de NaOH consumido pela amostra (mL)

Vol. med. controle = média do volume de NaOH consumido pelo controle (mL)

$M_{NaOH}$  = molaridade da solução de NaOH (mol/L)

t = tempo de reação (min)

V amostra = volume da amostra utilizada na reação (mL)

#### 4.4.5 Grau de Intumescimento dos Hidrogéis

A análise do grau de intumescimento (GI) dos hidrogéis foi realizada com base no trabalho de Lee e Bae (2015), em que foram utilizados 50 mg de cada hidrogel em diferentes tipos de meio: fluido gástrico simulado (solução HCl 100 mM pH=1,2), fluido intestinal simulado (solução tampão fosfato de sódio 100 mM pH=5,5) e água destilada (pH=7,2), em temperatura de 37 °C e 200 rpm de agitação, sendo as massas monitoradas no tempo zero e após duas horas. Para realizar a pesagem dos hidrogéis utilizou-se papel absorvente para remover resíduos dos meios que permaneceram nas superfícies destes. Todos os testes foram realizados em triplicata e o GI foi calculado pela eq.6 (GUPTA; JABRAIL, 2006):

$$GI = \left( \frac{m_{tf} - m_{t0}}{m_{t0}} \right) \times 100\% \quad (eq.6)$$

GI = grau de intumescimento

$m_{tf}$  = massa hidrogel após 2h

$m_{t0}$  = massa hidrogel no tempo zero

#### 4.4.6 Perfil de Intumescimento dos Hidrogéis

Um perfil de intumescimento (PI) foi construído a partir da metodologia empregada por Dini, Islan e Castro (2014), em que foram colocados 200 mg de cada um dos hidrogéis preparados em 100,00 mL de fluido gástrico simulado, a 37 °C e 200 rpm, sendo as massas pesadas nos tempos 15, 30, 60, 90, 120 min. Após duas horas, esses hidrogéis foram retirados do fluido gástrico simulado e monitorados por mais uma hora, a cada 10 min, em fluido intestinal simulado. Antes da pesagem das massas os hidrogéis foram secos em papel absorvente. Todos os testes foram realizados em triplicata.

#### 4.4.7 Estudos de Liberação da Pancreatina

O estudo de liberação da pancreatina encapsulada em diferentes hidrogéis foi realizado a partir de adequações da metodologia empregada por Dini, Islan e Castro (2014) e pelo método geral do teste de dissolução fornecido tanto pela *Farmacopéia Brasileira* (BRASIL, 2010) quanto pela USP 32 (2009), em que foram colocados 200 mg de cada um dos hidrogéis preparados em 100,00 mL de meio gástrico simulado, a 37 °C e 200 rpm, sendo coletadas alíquotas de 2 mL, com subsequente reposição do meio, nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 min. Após duas horas em fluido gástrico simulado este foi retirado e os hidrogéis foram monitorados por mais uma hora em fluido intestinal simulado, com coletas de alíquotas de 2 mL, a cada 10 min, também com reposição do meio. As atividades das enzimas foram analisadas, separadamente, para cada alíquota coletada conforme os testes de atividades apresentados anteriormente. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Também foi avaliada a liberação de uma formulação disponível no mercado, o Creon®, sendo este submetido ao mesmo tratamento utilizado para os hidrogéis. Para isso, foram pesadas massas de 200 mg de esferas revestidas do Creon® e colocadas em 100,00 mL de fluido gástrico simulado, a 37 °C e 200 rpm, sendo coletadas alíquotas de 2 mL, com subsequente reposição do meio, nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 min. Após duas horas em fluido gástrico simulado este foi retirado e os hidrogéis foram monitorados por mais uma hora em fluido intestinal simulado, com coletas de alíquotas de 2 mL, a cada 10 min, também com reposição do novo

meio. As atividades das enzimas foram analisadas separadamente em cada alíquota coletada conforme os testes de atividades já apresentados. Todos os testes foram realizados em triplicata.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos no processo de preparo e caracterização dos hidrogéis, e ainda, nos estudos de liberação retardada da pancreatina contida nos hidrogéis e na formulação comercialmente disponível no mercado.

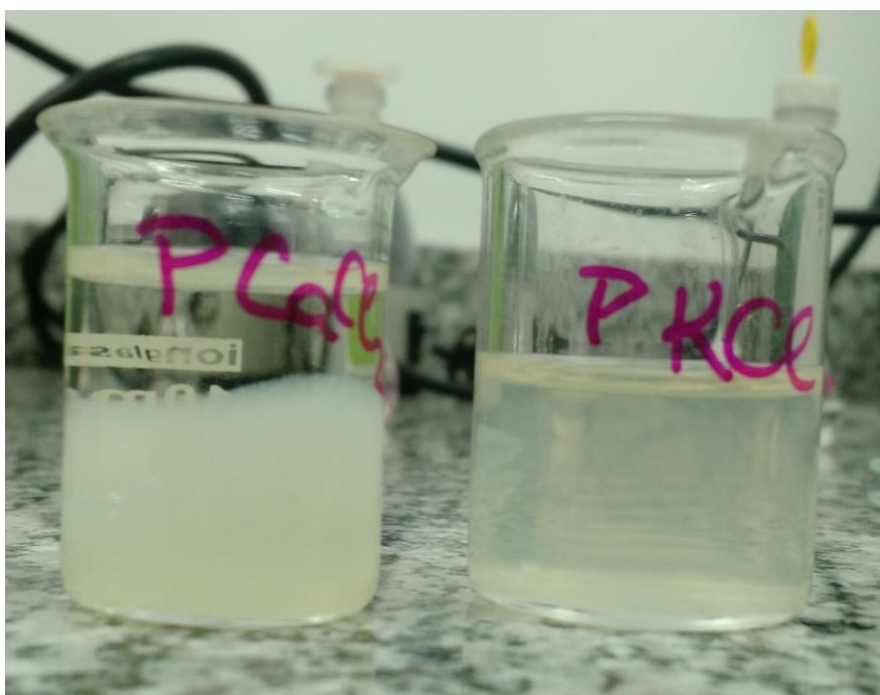
### 5.1 PREPARO DOS HIDROGÉIS

Inicialmente, foi realizado um estudo a fim de descobrir as melhores concentrações das soluções poliméricas e salinas para a preparação dos hidrogéis. As soluções poliméricas foram preparadas com água destilada e a carga de pancreatina foi adicionada às soluções salinas. Durante o processo de preparo dos hidrogéis em solução aquosa, foi possível observar que utilizando soluções de concentração de 0,5% (m/v) de polímero e 2,0% (m/v) de  $\text{CaCl}_2$  não houve a formação de hidrogel, entretanto, a partir de soluções de 1,5 e 2,5% (m/v) de alginato e 2,0% (m/v) de  $\text{CaCl}_2$  percebeu-se que o aumento da concentração de polímero resultou na formação de esferas que se apresentaram mais rígidas e homogêneas à medida que a concentração da solução polimérica foi aumentada. Tentou-se ainda, promover a formação de esferas de alginato com uma concentração mínima de solução salina, a fim de que sua presença interferisse o mínimo possível na atividade enzimática. Porém, durante o desenvolvimento desta metodologia foi possível perceber que houve a precipitação das proteínas em meio salino, como apresentado na figura 10, confirmados por meio de testes espectrofotométricos preliminares, de forma que o contato direto com a solução salina promoveu a inativação de cerca de 76% de todas as enzimas. Essa precipitação se deve ao efeito de força iônica presente no sistema, chamado *salting out*, que implica na tendência que as moléculas de água têm em solvatar, preferencialmente, os íons o que resulta no aumento das interações entre as moléculas proteicas.

Por isso, a fim de evitar o contato direto da solução salina com as enzimas e proporcionar maior estabilidade, foram realizadas modificações na metodologia de preparo dos hidrogéis, de forma que as soluções poliméricas e enzimáticas passaram a ser preparadas utilizando-se de solução tampão 50 mM Tris/HCl pH 7,5. Assim, a solução polimérica passou a ser carregada com a solução enzimática, o que requereu um novo estudo a fim de adequar as concentrações

das soluções poliméricas e salinas à essa nova condição. Com isso, observou-se a necessidade de aumentar da concentração da solução polimérica, uma vez que a presença de sais, da solução tampão, aumentou a força iônica do sistema levando à modificação da solubilidade das moléculas dos biopolímeros em solução, já que estas também apresentam cargas. Como a quantidade de sal proveniente da solução tampão é pequena, os íons presentes em meio aquoso interagem com as moléculas dos biopolímeros, diminuindo a interação existente entre elas, e consequentemente, aumentam sua solubilidade, o que é desfavorável para a formação de reticulação. O aumento da concentração do polímero promoveu um aumento da interação entre as moléculas, proporcionando maior reticulação ao hidrogel (TOMÉ et al., 2013). Nessa nova metodologia houve, também, a troca da utilização de buretas por seringas, uma vez que a carragenana apresentou alta viscosidade durante o processo de aquecimento e resfriamento, o que levou ao entupimento das buretas; logo a utilização de seringas teve como objetivo contribuir com o fator pressão que passou a ser aplicado sobre o sistema, e ainda, proporcionar um maior aproveitamento das soluções poliméricas no processo de preparo de hidrogéis.

Figura 10 – Fotografia da precipitação das proteínas em presença de solução salina.



Fonte: Do autor

De acordo com o estudo realizado por Bhushan, Parshad e Qazi (2008) lipases de *Arthrobacter sp.* foram encapsuladas em hidrogel de alginato-Ca em diferentes concentrações de polímero, com o objetivo de comparar a estabilidade destas com enzimas livres, em

diferentes pH's, temperaturas e tempo de estocagem. Para isso, foram obtidos hidrogéis em concentrações que variavam entre 0,5 e 2,5% (m/v) de alginato, em meio aquoso, de forma que o hidrogel que proporcionou maior atividade à lipase encapsulada foi produzido com 1,5% (m/v) de polímero. Concentrações maiores de biopolímero levaram à diminuição da atividade da lipase devido à maior interação entre as cadeias do polímero que permitiu produzir um material mais reticulado. Entretanto, uma drástica redução do tamanho de poros do material dificultou a acessibilidade ao substrato devido à dificuldade de permeação das enzimas.

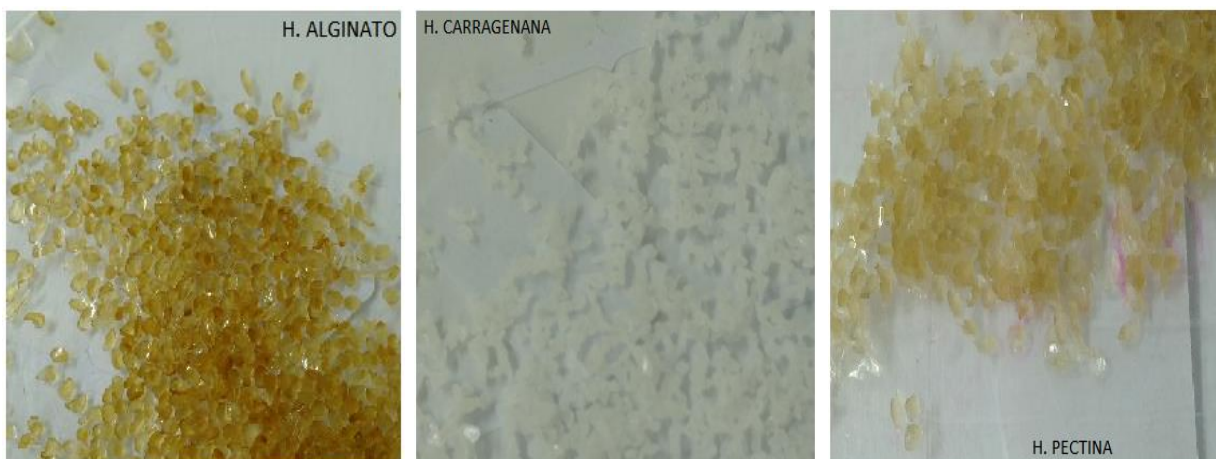
De forma análoga a solução polimérica da carragenana foi preparada em água destilada, e posteriormente, passou a ser preparada em solução tampão 50 mM Tris/HCl pH 7,5, buscando maior estabilidade para as enzimas presentes na formulação da pancreatina. Os hidrogéis obtidos em solução aquosa, com 1,5% (m/v) de carragenana e 0,55% e 0,75% (m/v) de KCl, formaram esferas pouco resistentes. Mantendo-se a concentração de polímero e aumentando a concentração de aglutinante para 1,5% (m/v) foram produzidas esferas achatadas, que durante a secagem ainda sofriam deformação. Estes resultados poderiam ser explicados pelas baixas interações intermoleculares entre cadeias adjacentes do polímero que levou à obtenção de géis com baixa resistência mecânica. Somente com concentração de 2,2% (m/v) de solução polimérica e 1,2% (m/v) de solução de KCl foi possível obter um hidrogel esférico e rígido. Porém, a obtenção de esferas de carragenana em meio tamponado requereu um aumento da concentração de polímero e também da solução salina, de forma que as concentrações que possibilitaram a formação de esferas rígidas foi de 3,5% e 4,5% (m/v) de solução de carragenana e KCl, respectivamente. A concentração de 3,5% (m/v) empregada no preparo destes hidrogéis foi a máxima concentração de carragenana possível de solubilizar em solução tampão 50 mM Tris/HCl pH 7,5.

Os hidrogéis de pectina foram preparados, apenas, em meio tamponado, uma vez que durante os estudos de concentração de soluções poliméricas e salinas para o preparo de hidrogéis, em meio aquoso, o biopolímero adequado, ou seja, de baixo grau de esterificação, ainda não tinha sido adquirido. Com isso, foram preparados hidrogéis com 1,5 % (m/v) de solução de pectina e 0,375% e 0,5% (m/v) de solução de  $\text{CaCl}_2$ , que formaram esferas muito frágeis mecanicamente. Aumentando a concentração de polímero para 3,0% (m/v) e 0,75% (m/v) de aglutinante foi possível preparar esferas mais homogêneas e resistentes. Estas concentrações foram as mesmas adotadas para o hidrogel de alginato.

Durante o preparo dos hidrogéis, as soluções poliméricas de alginato e pectina foram resfriadas até temperatura ambiente para que houvesse a homogeneização destas com as respectivas soluções enzimáticas, porém, as soluções poliméricas de carragenana foram

resfriadas até a temperatura de 40 °C, uma vez que o resfriamento à temperatura ambiente levou ao aumento da viscosidade da solução até sua gelificação, o que comprometeu o preparo dos hidrogéis devido ao entupimento das agulhas das seringas.

Figura 11 – Fotografia dos hidrogéis preparados, após a secagem.



Fonte: Do autor.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

Os hidrogéis, controle e carregado, dos diferentes polímeros foram caracterizados por meio da análise termogravimétrica, infravermelho e microscopia eletrônica de varredura. Também foram avaliadas a eficiência de encapsulação dos hidrogéis obtidos, analisando separadamente as atividades das enzimas presentes, assim como, o grau de intumescimento e o perfil de intumescimento destes.

### 5.2.1 Análise Termogravimétrica

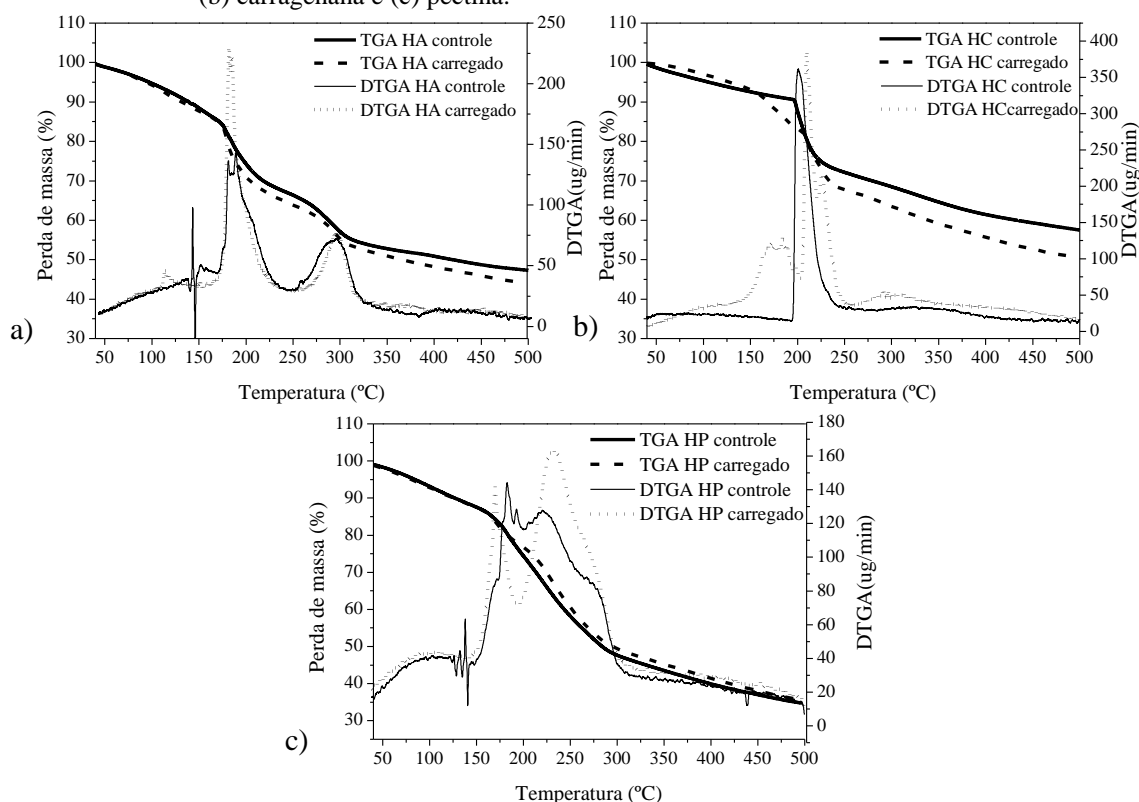
Para a realização da análise termogravimétrica foram utilizadas esferas secas dos diferentes hidrogéis, tanto controle quanto carregado. De acordo com estudos realizados por Paula et al. (2010), as esferas de hidrogel de alginato (HA) possuem três etapas de degradação, sendo a perda de água, seguida da formação de carbonatos e depois a carbonização das cadeias

poliméricas. Como as análises foram realizadas até 500 °C não foi possível observar a conclusão da última etapa descrita. Os dados obtidos apresentaram uma redução de massa de 10,6%, por perda de água, na faixa de 70 a 133 °C, e aproximadamente 36,6% próximo de 253 °C. O hidrogel de alginato carregado exibiu um perfil bem parecido ao do hidrogel controle, apresentando perdas de massas bem próximas em faixas de temperatura muito semelhantes. Após 250 °C a perda de massa do hidrogel carregado foi menor quando comparado ao hidrogel controle, o que pode estar relacionado com uma maior estabilidade deste material, porém não foram encontrados na literatura dados que confirmassem essa observação (FIGURA 12a).

Na análise TG, o hidrogel de carragenana (HC) controle apresentou apenas uma perda de massa de 32,5% entre 194 e 250 °C, enquanto o hidrogel carregado apresentou três perdas de massa, de 32,2% entre 150 e 202 °C, 4,8% entre 206 e 258 °C, e ainda, 7,3% entre 264 e 348 °C (FIGURA 12b).

Já a análise TG do hidrogel de pectina (HP) controle exibiu apenas uma perda de massa de 40% entre 150 e 300 °C (figura 12c), enquanto o hidrogel carregado permitiu observar duas perdas de massa, a primeira perda de 13% entre 150 e 188 °C e a segunda de 37% entre 190 e 300 °C.

Figura 12 – TGA e DTGA das amostras de hidrogel controle e carregado de (a) alginato, (b) carragenana e (c) pectina.



Fonte: Do autor.

Embora os hidrogéis tenham permanecido em geladeira durante o processo de secagem até obtenção de massa constante, foi possível observar que os hidrogéis ainda mantiveram, aproximadamente, 40% de umidade, e isto se deve à grande capacidade absorptiva destes materiais.

### 5.2.2 Espectroscopia de Infravermelho

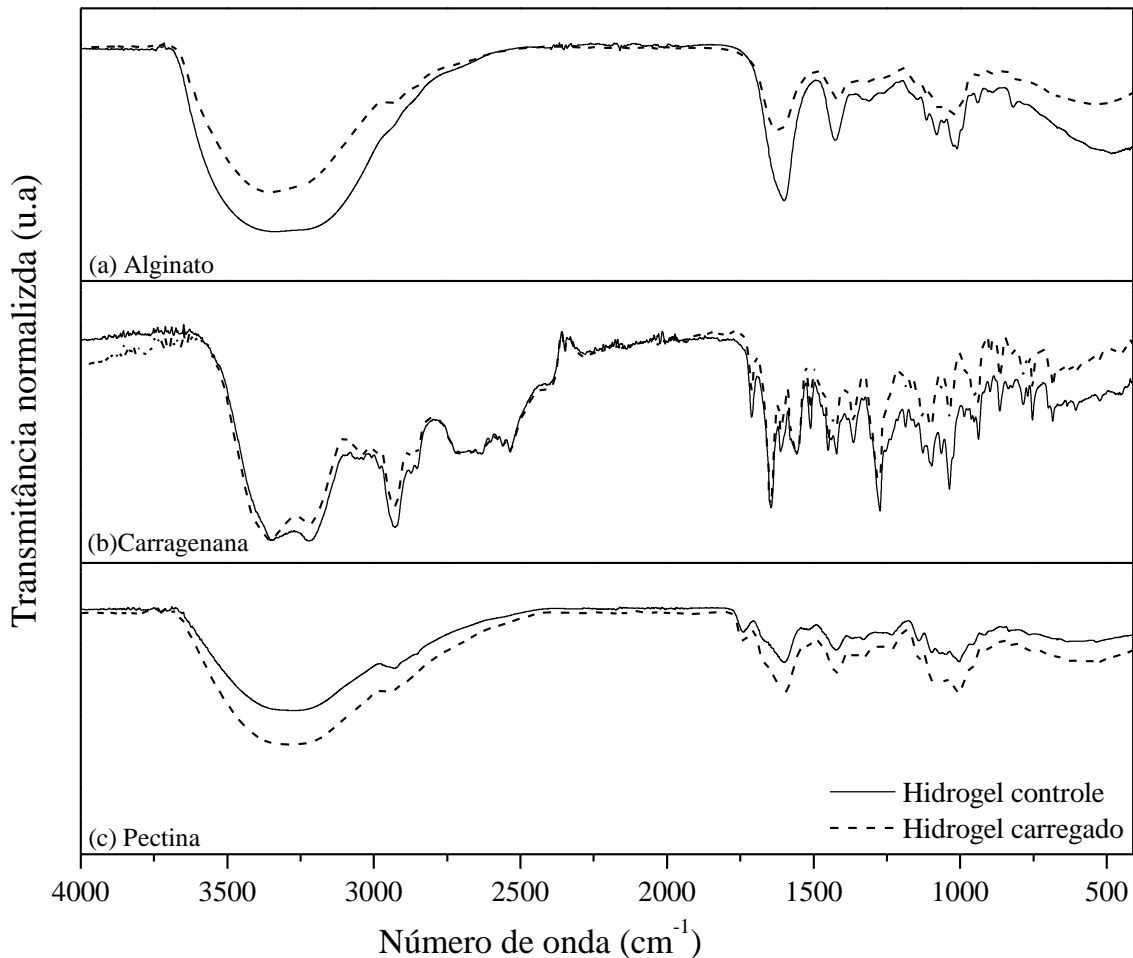
Para a realização da análise termogravimétrica foram utilizadas esferas secas dos diferentes hidrogéis, tanto controle quanto carregado. Ao comparar os hidrogéis controle e seus respectivos hidrogéis carregados foi possível perceber pequenos deslocamentos e alargamentos de bandas, e ainda, discretas diferenças de intensidade, embora as bandas apresentadas fossem sempre as mesmas. Não foram encontrados relatos ou espectros sobre a pancreatina na literatura, porém, devido à semelhança existente entre os espectros obtidos foi possível afirmar que não houve interação entre as matrizes poliméricas e a pancreatina presente nos hidrogéis carregados, de forma que a pancreatina foi encapsulada em seu interior, não podendo ser detectada. Com isso, as análises de infravermelho serviram apenas para caracterizar as superfícies dos hidrogéis.

Os espectros obtidos a partir do hidrogel de alginato controle e do hidrogel de alginato carregado, apresentaram-se muito semelhantes (FIGURA 13a). O hidrogel de alginato controle exibiu a banda relativa ao estiramento OH em  $3.334\text{ cm}^{-1}$ , com maior intensidade, enquanto o hidrogel carregado apresentou em  $3.354\text{ cm}^{-1}$ . Bandas de deformação simétrica do  $\text{COO}^-$  exibidas em  $1.600\text{ cm}^{-1}$  e  $1.425\text{ cm}^{-1}$  para o hidrogel controle e sofreram deslocamento para  $1.621\text{ cm}^{-1}$  e  $1.417\text{ cm}^{-1}$ , para o hidrogel carregado (LUCAS, 2007). Para Ferraz et al. (2001) a banda apresentada pelos hidrogéis controle e carregado em  $1.311\text{ cm}^{-1}$ , também são referentes a deformação de  $\text{COO}^-$ . Segundo Sartori et al. (1997), a banda próxima à  $1.420\text{ cm}^{-1}$  ( $1.425$  e  $1.417\text{ cm}^{-1}$ ) está relacionada a ligações iônicas e a substituição de íons sódio por cálcio. Segundo Sartori et al. (1997) as bandas  $1.023$  e  $891\text{ cm}^{-1}$  para o hidrogel carregado, e ainda,  $1.010$  e  $890\text{ cm}^{-1}$  para o hidrogel controle se devem à estiramentos C-C. Já as bandas de  $940$  e  $941\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente referentes ao hidrogel controle e carregado, estão relacionadas ao estiramento C-O. Não foi detectada a presença de ácido algínico nos espectros, uma vez que uma banda próxima a  $1.747\text{ cm}^{-1}$  não apareceu.

A Figura 13b apresenta os espectros obtidos a partir das amostras de hidrogel de carragenana carregado e controle, em que foram observados banda de estiramento OH em  $3.352\text{ cm}^{-1}$  e banda de estiramento C-H em  $2.930\text{ cm}^{-1}$  (CERQUEIRA et al., 2011). De acordo com Ning et al. (2007) as bandas  $1.023$  e  $1.031\text{ cm}^{-1}$  para o hidrogel de controle, e ainda,  $918\text{ cm}^{-1}$  para o hidrogel carregado correspondem à C-O de agrupamento C-O-C, relativos à ligação glicosídica. Foram observadas bandas relativas a presença de sulfato secundário axial de C-O-S em C-4 de galactose para o hidrogel carregado e controle, respectivamente, a  $844$  e  $846\text{ cm}^{-1}$ , para 3,6-anidro-D-galactose em  $908$  e  $906\text{ cm}^{-1}$  e para estiramento de grupamento sulfato em  $1.497$  e  $1.496\text{ cm}^{-1}$  (ELSUPIKHE et al., 2015).

Os espectros obtidos a partir do hidrogel de pectina controle e carregado foram muito semelhantes (FIGURA 13c). Eles mostraram bandas relativas ao estiramento OH em  $3.281\text{ cm}^{-1}$ , estiramento C-H em  $2.942\text{ cm}^{-1}$ ,  $1.600$  e  $1.598\text{ cm}^{-1}$  para água de ligação polimérica,  $1.048\text{ cm}^{-1}$  para ligação glicosídica e em  $916\text{ cm}^{-1}$  para 3,6-anidro-D-galactose.

Figura 13 – Espectros de infravermelho comparando o hidrogel controle de alginato (a), carragenana (b) e pectina (c) com os respectivos hidrogéis carregados.

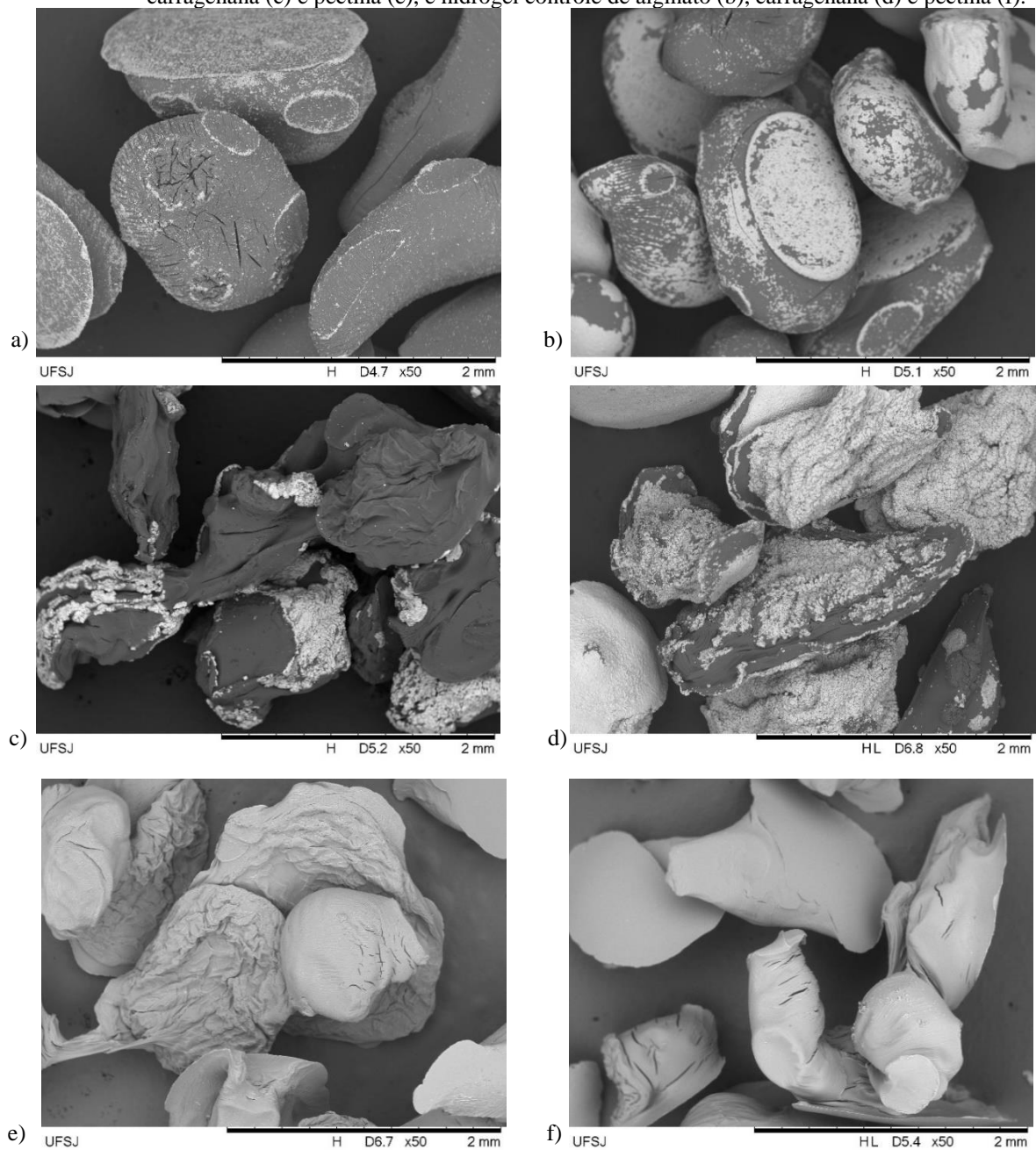


Fonte: Do autor.

### 5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada tanto com os hidrogéis controle, de cada biopolímero, quanto com os respectivos hidrogéis carregados com pancreatina, a fim de verificar modificações das morfologias dos entre os hidrogéis preparados (FIGURA 14).

Figura 14 – Microscopias eletrônicas de varredura das amostras de hidrogel carregado de alginato (a), carragenana (c) e pectina (e), e hidrogel controle de alginato (b), carragenana (d) e pectina (f).



Fonte: Do autor.

Por meio dessa análise é possível perceber que, de forma geral, os hidrogéis apresentaram diferentes morfologias, o que se deve a conformação das cadeias de cada polímero e interação com seu agente reticulante. Ao observar cada microscopia, também, é possível observar que existe diferença entre as “esferas” preparadas, e isso, pode ser atribuído ao processo de preparação manual dos hidrogéis.

Quanto ao hidrogel de alginato carregado (figura 14 a) e hidrogel de alginato controle (figura 14 b), foi possível notar superfícies mais esféricas e lisas, de forma que o hidrogel carregado apresentou fissuras em sua estrutura.

Já os hidrogéis de carragenana carregado (figura 14 c) e hidrogel de carragenana controle (figura 14 d), foi possível observar superfícies irregulares e rugosas, de forma que o hidrogel carregado apresentou maior rugosidade em sua estrutura.

Com relação aos hidrogéis de pectina carregado (figura 14 e) e hidrogel de pectina controle (figura 14 f), notou-se superfícies mais irregulares e rugosas no hidrogel carregado, enquanto o hidrogel controle apresentou superfícies mais lisas e com inúmeras fissuras.

Embora os hidrogéis dos variados biopolímeros tenham apresentado morfologias distintas, observou-se maior similaridade das “esferas” formadas pelos hidrogéis de alginato, tanto controle quanto carregado.

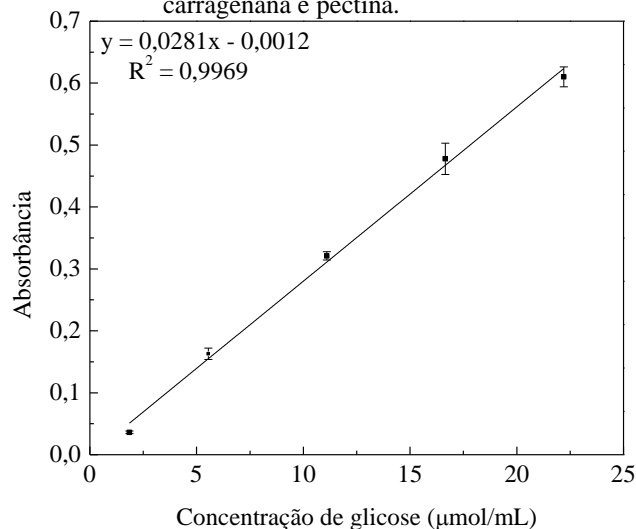
#### **5.2.4 Eficiência de Encapsulação dos Hidrogéis**

A literatura especializada destaca a presença de três principais enzimas existentes na da pancreatina como amilase, protease e lipase (WALLACE; SHARKEY, 2011). Conseqüentemente, estudos foram conduzidos para a determinação da atividade catalítica de cada enzima e os resultados descritos a seguir. Para todos os testes foi estabelecida a temperatura de 37 °C, a fim de simular a temperatura do organismo humano.

##### **5.2.4.1 $\alpha$ -amilase**

A figura 14 apresenta a curva analítica obtida para calcular a atividade da  $\alpha$ -amilase, a partir da concentração da glicose (produto final da reação).

Figura 15 – Curva analítica para avaliar a atividade da  $\alpha$ -amilase nos hidrogéis de alginato, carragenana e pectina.



Fonte: Do autor.

Os limites de detecção (LD) (eq.7) e do limite de quantificação (LQ) (eq.8) foram determinados considerando o desvio padrão ( $s$ ), gerado a partir da análise do controle em que o valor obtido foi de 0,0007, e o coeficiente angular fornecido pela curva analítica ( $S$ ) foi de 0,0281, conforme o guia do ICH (2005). Com isso, os limites de detecção e de quantificação encontrados foram de 0,082 e 0,249  $\mu\text{mol/mL}$ , respectivamente. De acordo com o ICH (2005), LD é a menor quantidade de um analito que o equipamento é capaz de detectar, mas não necessariamente é capaz de quantificar. Já o LQ é a menor quantidade de um analito que pode ser quantificada, com precisão e exatidão adequadas. Todos os valores obtidos no teste de atividade da  $\alpha$ -amilase foram maiores que o LD e o LQ, confirmando a validade dos dados obtidos.

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (\text{eq.7})$$

$$LQ = 10 \frac{s}{S} \quad (\text{eq.8})$$

Conforme os dados apresentados na tabela 4, para o hidrogel de alginato foram disponibilizados, aproximadamente,  $232,23 \pm 0,34$  U de  $\alpha$ -amilase, e restaram na solução salina após o preparo do hidrogel, em torno de  $190,12 \pm 1,36$  U de  $\alpha$ -amilase, resultando numa EE de  $18 \pm 1\%$ . Já para o hidrogel de carragenana foram disponibilizados, aproximadamente,  $232,81 \pm 0,89$  U de  $\alpha$ -amilase, e restaram na solução salina após o preparo do hidrogel, em torno de  $204,98 \pm 0,81$  U de  $\alpha$ -amilase, resultando numa EE de  $12 \pm 0\%$ . E para o hidrogel de

pectina carregado foram disponibilizados, aproximadamente,  $233,59 \pm 1,21$  U de  $\alpha$ -amilase, e restaram na solução salina após o preparo do hidrogel, em torno de  $215,25 \pm 0,30$  U de  $\alpha$ -amilase, resultando numa EE de  $8 \pm 1\%$ .

Após as análises da atividade de  $\alpha$ -amilase, para todos os hidrogéis, foi possível perceber que houve uma dificuldade em disponibilizar esta enzima, uma vez que as médias de atividade obtida nas soluções enzimáticas apresentaram pouco mais que 230 U, enquanto a atividade teórica calculada foi de 100.000 U. Essa dificuldade pode estar relacionada com a baixa solubilidade desta enzima no tampão Tris/HCl, ou ainda, com algum fator que possa ter causado grande perda de atividade. Embora a quantidade de enzima disponibilizada tenha sido pequena, houve encapsulação de  $\alpha$ -amilase, resultando numa baixa EE desta.

Considerando os valores médios de EE e os desvios encontrados pode-se afirmar que o hidrogel de alginato foi o que proporcionou maior encapsulação da  $\alpha$ -amilase, quando comparado aos demais hidrogéis, de forma que sua eficiência de encapsulação foi 1,5 e 2,3 vezes maior que a EE dos hidrogéis de carragenana e pectina, respectivamente.

Tabela 4- Dados médios de atividade, balanço de massas e eficiência de encapsulação de  $\alpha$ -amilase obtidos no preparo dos diferentes hidrogéis.

		<b>Atividade média</b> <b>(U.mL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Balanço de massas médio</b> <b>(U)</b>	<b>EE média</b> <b>(%)</b>
<b>Alginato</b>	<b>Sol. Enzimática</b>	$4,74 \pm 0,01$	$232,23 \pm 0,34$	$18 \pm 1$
	<b>Sol. Salina</b>	$3,88 \pm 0,03$	$190,12 \pm 1,36$	
<b>Carragenana</b>	<b>Sol. Enzimática</b>	$4,75 \pm 0,02$	$232,81 \pm 0,89$	$12 \pm 0$
	<b>Sol. Salina</b>	$4,18 \pm 0,02$	$204,98 \pm 0,81$	
<b>Pectina</b>	<b>Sol. Enzimática</b>	$4,77 \pm 0,02$	$233,59 \pm 1,21$	$8 \pm 1$
	<b>Sol. Salina</b>	$4,39 \pm 0,01$	$215,25 \pm 0,30$	

Fonte: Do autor.

Quanto as massas finais dos hidrogéis carregados, após processo de secagem até obtenção de massas constantes, conforme apresentado na tabela 5, foi possível observar que o hidrogel de alginato foi o que proporcionou maior rendimento de massa em relação aos demais, sendo a massa obtida 1,7 vezes maior que a massa de hidrogel de pectina e 1,3 vezes maior que a massa de hidrogel de carragenana. Portanto, para a encapsulação de 1 U seriam necessários 54,95 mg de hidrogel de alginato, 62,89 mg de hidrogel de carragenana, 74,07 mg de hidrogel de pectina.

Tabela 5 – Massas médias dos hidrogéis carregados, após o processo de secagem, e as respectivas atividades de  $\alpha$ -amilase encapsulada por mg de hidrogel.

	Massa média de hidrogel carregado (g)	Atividade média de $\alpha$ -amilase encapsulada (U/mg)
<b>Alginato</b>	2,3106 $\pm$ 0,0122	0,0182 $\pm$ 0,0007
<b>Carragenana</b>	1,7527 $\pm$ 0,0573	0,0159 $\pm$ 0,0005
<b>Pectina</b>	1,3585 $\pm$ 0,0278	0,0135 $\pm$ 0,0012

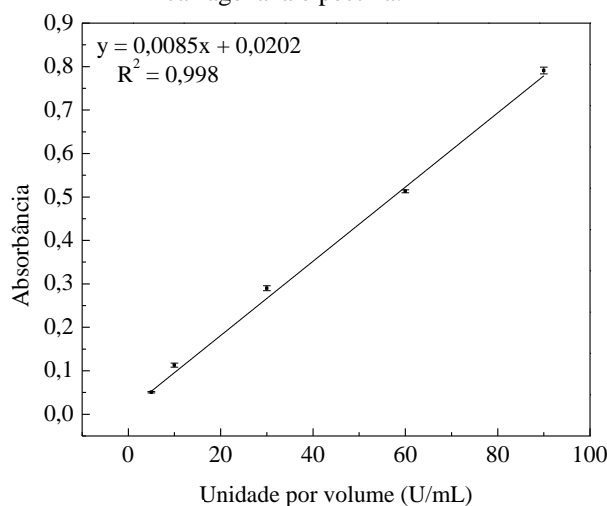
Fonte: Do autor.

#### 5.2.4.2 Protease

A Figura 16 apresenta a curva analítica obtida para calcular a atividade da protease, a partir da hidrólise da azocaseína. Devido à presença de vários tipos de proteases (tripsina, quimotripsina e elastase) existentes na formulação da pancreatina, diferentes ligações são clivadas, de forma que não há a formação de um produto específico (LAUWERS; RUYSSSEN, 1968).

Os valores de LD e LQ foram determinados considerando as eq.7 e eq.8. O desvio-padrão ( $s$ ) obtido a partir da análise do branco foi de 0,0003 e o coeficiente angular da curva analítica, 0,0085. Com isso, LD e LQ encontrados foram, 0,115 e 0,350 U/mL, respectivamente, sendo que todos os valores obtidos neste teste de atividade foram superiores aos valores de LD e o LQ.

Figura 16 – Curva analítica para avaliar a atividade da protease nos hidrogéis de alginato, carragenana e pectina.



Fonte: Do autor.

Conforme apresentado na tabela 6, foram disponibilizados no processo de encapsulação para o hidrogel de alginato, aproximadamente,  $38.870 \pm 240$  U, restando  $18.439,37 \pm 38,43$  U, sendo encapsulados  $53 \pm 0\%$ . Para o processo de encapsulação por meio do hidrogel de carragenana foram disponibilizados  $38.984,78 \pm 352,23$  U, restando  $8.726,48 \pm 58,71$  U, sendo encapsulados  $78 \pm 0\%$ . Por outro lado, para o hidrogel de pectina foram disponibilizados inicialmente  $39.138,51 \pm 176,12$  U e ao final do processo de encapsulação restaram  $32.060 \pm 291$  U, com uma eficiência de encapsulação de  $18 \pm 1\%$ .

Após as análises da atividade de protease, para todos os hidrogéis, foi possível observar que esta foi a enzima melhor disponibilizada, uma vez que as médias de atividade obtida nas soluções enzimáticas apresentaram quase 40.000 U, enquanto a atividade teórica foi de 100.000 U.

Tabela 6 – Dados médios de atividade, balanço de massas e eficiência de encapsulação de protease obtidos no preparo dos diferentes hidrogéis.

		<b>Atividade média</b> <b>(U.mL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Balanço de massas</b> <b>médio (U)</b>	<b>EE média</b> <b>(%)</b>
<b>Alginato</b>	<b>Sol. Enzimática</b>	$793,3 \pm 4,9$	$38.870 \pm 240$	$53 \pm 0$
	<b>Sol. Salina</b>	$376,31 \pm 0,78$	$18.439,37 \pm 38,43$	
<b>Carragenana</b>	<b>Sol. Enzimática</b>	$795,61 \pm 7,19$	$38.984,78 \pm 352,23$	$78 \pm 0$
	<b>Sol. Salina</b>	$178,1 \pm 1,2$	$8.726,48 \pm 58,71$	
<b>Pectina</b>	<b>Sol. Enzimática</b>	$789,75 \pm 3,59$	$39.138,51 \pm 176,12$	$18 \pm 1$
	<b>Sol. Salina</b>	$654,33 \pm 5,94$	$32.060 \pm 291$	

Fonte: Do autor.

Considerando os valores médios de EE e os desvios encontrados pode-se afirmar que o hidrogel de carragenana foi o que proporcionou maior encapsulação da protease, seguido do hidrogel de alginato, e posteriormente, do hidrogel de pectina. Com isso, a EE do hidrogel de alginato e pectina foram, respectivamente, 1,5 e 4,3 vezes menores quando comparadas à EE do hidrogel de carragenana.

Em relação as massas finais dos hidrogéis carregados, após secagem até obtenção de massas constantes, conforme apresentado na tabela 7, foi possível observar que embora o hidrogel de alginato tenha apresentado maior rendimento de massa, o hidrogel de carragenana

foi o que apresentou maior atividade por mg de hidrogel obtido. Portanto, a EE de protease por mg de hidrogel de alginato foi, aproximadamente, 2 vezes menor e para o hidrogel de pectina, aproximadamente, 3,3 vezes menor que a EE apresentada pelo hidrogel de carragenana. Sendo assim, para a encapsulação de 1 U seriam necessários 0,11 mg de hidrogel de alginato, 0,06 mg de hidrogel de carragenana, 0,19 mg de hidrogel de pectina.

Tabela 7 – Massas médias dos hidrogéis carregados, após o processo de secagem, e as respectivas atividades de protease encapsulada por mg de hidrogel.

	<b>Massa média de hidrogel carregado (g)</b>	<b>Atividade média de protease encapsulada (U/mg)</b>
<b>Alginato</b>	2,3106 ± 0,0122	8,84 ± 0,11
<b>Carragenana</b>	1,7527 ± 0,0573	17,28 ± 0,58
<b>Pectina</b>	1,3585 ± 0,0278	5,21 ± 0,38

Fonte: Do autor.

#### 5.2.4.3 Lipase

Ao testar o método utilizado por Terra et al. (2016) encontrou-se grande dificuldade em homogeneizar a fazer aquosa, contendo enzima em tampão, com a fase orgânica, contendo o substrato em isopropanol. Uma modificação da ordem dos reagentes foi realizada na tentativa de melhorar a miscibilidade, colocando primeiramente, o substrato, seguido da solução enzimática, e posteriormente, a solução-tampão, resultando em pequena melhoria. Porém, após a adição do reagente de parada da reação (SDS) foi observada a formação de partículas muito finas que permaneciam em suspensão mesmo após centrifugação. De acordo com Gomes et al. (2011) essa turbidez é decorrente da formação do ácido palmítico formado, substância insolúvel em água, o que dificulta a utilização desta substância em métodos espectrofotométricos. Devido às dificuldades encontradas na execução desse método, optou-se por testar o método utilizado nos estudos de Kanwar et al. (2005). A persistência em tentar adequar um método espectrofotométrico se deve ao fato de que, normalmente, os métodos são rápidos, exigem pequenos volumes de amostras (GOMES et al., 2011), além dos reagentes e equipamentos serem de fácil aquisição. A proposta inicial foi de que todos os testes de atividades seriam realizados pelo mesmo método.

O segundo método testado proporcionou melhor homogeneização das fases aquosa e orgânica, e o reagente de parada da reação utilizado (mistura de acetona/etanol empregado a 4 °C, *overnight*) apresentou-se muito mais efetivo que o SDS, pois foi possível a obtenção de um sobrenadante límpido para a análise em espectrofotômetro. Porém, como problema, este método apresentou uma grande dificuldade de repetibilidade dos resultados, tornando o método pouco confiável. Diante das dificuldades encontradas em adequar um método espectrofotométrico, optou-se por substituí-lo por um método titulométrico, recomendado pela USP 32 e Soares et al. (1999), sob algumas adequações. Este método apresentou-se como uma opção simples, rápida e de menor custo, quando comparada aos métodos anteriormente testados. Além disso, Gomes et al. (2011) afirma que o método titulométrico é capaz de proporcionar obtenção de maior atividade lipolítica, uma vez que o substrato utilizado permite maior interação com a enzima, simulando de forma mais real a reação que acontece no organismo.

Com isso, conforme tabela 8, foram disponibilizados no processo de encapsulação pelo hidrogel de alginato  $1.308,3 \pm 4,9$  U, restaram  $418,13 \pm 14,97$  U, sendo encapsulados  $68 \pm 1\%$ . Já para o hidrogel de carragenana foram disponibilizados no processo de encapsulação  $1.337,7 \pm 4,9$  U e restaram  $980,00 \pm 33,95$  U, sendo encapsulados  $27 \pm 3\%$ . Enquanto, para o hidrogel de pectina foram disponibilizados no processo de encapsulação  $1.332,8 \pm 4,9$  U, restaram  $1.189,07 \pm 14,97$  U, sendo encapsulados  $11 \pm 1\%$ .

Tabela 8 – Dados médios de atividade, balanço de massas e eficiência de encapsulação de lipase, obtidos no preparo dos diferentes hidrogéis.

		<b>Atividade média</b> <b>(U.mL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Balanço de massas</b> <b>médio (U)</b>	<b>EE média</b> <b>(%)</b>
<b>Alginato</b>	<b>Sol. Enzimática</b>	$26,70 \pm 0,1$	$1.308,3 \pm 4,9$	$68 \pm 1$
	<b>Sol. Salina</b>	$8,53 \pm 0,31$	$418,13 \pm 14,97$	
<b>Carragenana</b>	<b>Sol. Enzimática</b>	$27,3 \pm 0,1$	$1.337,7 \pm 4,9$	$27 \pm 3$
	<b>Sol. Salina</b>	$20,00 \pm 0,69$	$980,00 \pm 33,95$	
<b>Pectina</b>	<b>Sol. Enzimática</b>	$27,2 \pm 0,1$	$1.332,8 \pm 4,9$	$11 \pm 1$
	<b>Sol. Salina</b>	$24,27 \pm 0,31$	$1.189,07 \pm 14,97$	

Fonte: Do autor.

Quanto os valores médios de EE e os desvios encontrados pode-se afirmar que o hidrogel de alginato foi o que proporcionou maior encapsulação da lipase, quando comparado aos demais hidrogéis, de forma que sua eficiência de encapsulação foi 2,5 e 6,2 vezes maior que a EE dos hidrogéis de carragenana e pectina, respectivamente.

Tabela 9 – Massas médias dos hidrogéis carregados, após o processo de secagem, e as respectivas atividades de lipase encapsulada por mg de hidrogel.

	<b>Massa média de hidrogel carregado (g)</b>	<b>Atividade média de lipase encapsulada (U/mg)</b>
<b>Alginato</b>	2,3106 ± 0,0122	0,385 ± 0,007
<b>Carragenana</b>	1,7527 ± 0,0573	0,204 ± 0,016
<b>Pectina</b>	1,3585 ± 0,0278	0,106 ± 0,014

Fonte: Do autor.

Considerando as massas finais dos hidrogéis carregados (tabela 9), após o processo de secagem até obtenção de massas constantes, o hidrogel de alginato foi o que obteve maior eficiência de encapsulação de lipase, seguido do hidrogel de carragenana. Ao comparar a quantidade de enzima encapsulada por massa de hidrogel obtido, foi possível perceber que o hidrogel de alginato apresentou maior massa e EE por mg de hidrogel obtido, seguido dos hidrogéis de carragenana, e posteriormente, de pectina que apresentaram EE 1,9 e 3,6 vezes menor, respectivamente. Sendo assim, para a encapsulação de 1 U seriam necessários 2,60 mg de hidrogel de alginato, 4,90 mg de hidrogel de carragenana, 9,43 mg de hidrogel de pectina. Como os volumes de solução de NaOH obtidos nas titulações das soluções tampão e salina antes da formação do hidrogel foram iguais ou inferiores aos volumes obtidos pelo controle, percebeu-se que estas soluções não causaram interferências na atividade da lipase.

Com base nos testes de atividades realizados, o hidrogel de pectina foi o que apresentou menor EE para todas as enzimas, quando comparado aos demais hidrogéis. De acordo com Braccini e Pérez (2001), os hidrogéis de pectina têm estruturas mais desordenadas do que os hidrogéis de alginato, o que pode ter contribuído para a baixa encapsulação desta enzima. Não se pode descartar, também, a ideia de que os hidrogéis apresentam uma capacidade máxima de carregamento, que pode ser afetada pela organização estrutural das cadeias poliméricas.

### 5.2.5 Grau de Intumescimento dos Hidrogéis

As condições, como temperatura, agitação, soluções de diferentes pH's e tempo de exposição a cada pH, para a verificação do comportamento dos hidrogéis foram selecionadas a fim de simular as condições oferecidas pelo organismo humano, como temperatura corporal (37 °C), movimentos peristálticos e fluidos gástrico (pH=1,2) e intestinal (pH=5,5), e tempo em que os alimentos permanecem no estômago (2 h) e no intestino (1 h).

Este teste teve como princípio avaliar a capacidade absorviva das matrizes poliméricas quando estas foram submetidas à meios de diferentes pH's. Os grupos negativamente carregados presentes nestes hidrogéis, tais como grupos carboxílicos e sulfato, foram estabilizados quando interagiram com cátions presentes nas soluções salinas, durante o preparo dos hidrogéis. Porém, quando estes hidrogéis foram submetidos à um meio aquoso, a interação entre os cátions e as redes poliméricas carregadas negativamente foram enfraquecidas pela presença de moléculas de água, polares, uma vez que os átomos de hidrogênio, carregados positivamente serão atraídos pelas cargas negativas das cadeias de polímeros, forçando a abertura da matriz polimérica (GUPTA, 2015). Como o pH do meio é responsável pela modificação da forma carregada das redes de polímeros, as modificações de pH são responsáveis pela contração ou expansão da mesma. Por serem capazes de responderem às modificações de pH, tais materiais foram utilizados a fim de proteger moléculas sensíveis utilizando sua forma contraída e contribuindo para a liberação dessas moléculas encapsuladas utilizando a forma expandida, daí o motivo de serem conhecidos como sistemas inteligentes. Uma vez que o objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de um material capaz de proteger as enzimas pancreáticas do pH, extremamente, ácido do estômago e promover a liberação dessas no intestino, observou-se que as matrizes poliméricas confirmaram o comportamento esperado, uma vez que sofreram pequeno intumescimento em FGS, o que contribuiu para uma mínima deformação da matriz, o que seria responsável por uma baixa liberação enzimática. Isso foi verificado, principalmente com o hidrogel de alginato que apresentou um GI de aproximadamente 42%, enquanto o hidrogel de pectina apresentou GI quase 3 vezes maior e o hidrogel de carragenana apresentou um GI 5,5 vezes maior (TABELA 10, FIGURA 17).

Já em pH intestinal o desejável era de que houvesse o maior intumescimento possível, implicando numa deformação máxima levando à abertura dos poros dessa matriz, e conseqüentemente, na liberação das enzimas. Isto foi observado, uma vez que os hidrogéis de alginato e pectina apresentaram maiores GI, 1.578 e 1.785%, respectivamente, enquanto o hidrogel de carragenana apresentou GI, aproximadamente, 5 vezes menor (TABELA 10, FIGURA 17).

Alguns estudos relataram que hidrogéis de alginato, pectina e carragenana, sofrem alterações devido à variações de pH, de modo que no pH gástrico ocorre baixo intumescimento das matrizes, causando baixa liberação do fármaco devido à mudança de  $\text{COO}^-$  para  $\text{COOH}$ , para alginato e pectina, e  $\text{SO}_4^-$  para  $\text{SO}_4\text{H}$ , enquanto que no pH intestinal há um grande intumescimento e liberação rápida devido à repulsão eletrostática entre  $\text{COO}^-$ , para alginato e pectina, e entre ânions sulfato, para carragenana (LEONG et al., 2011a, b).

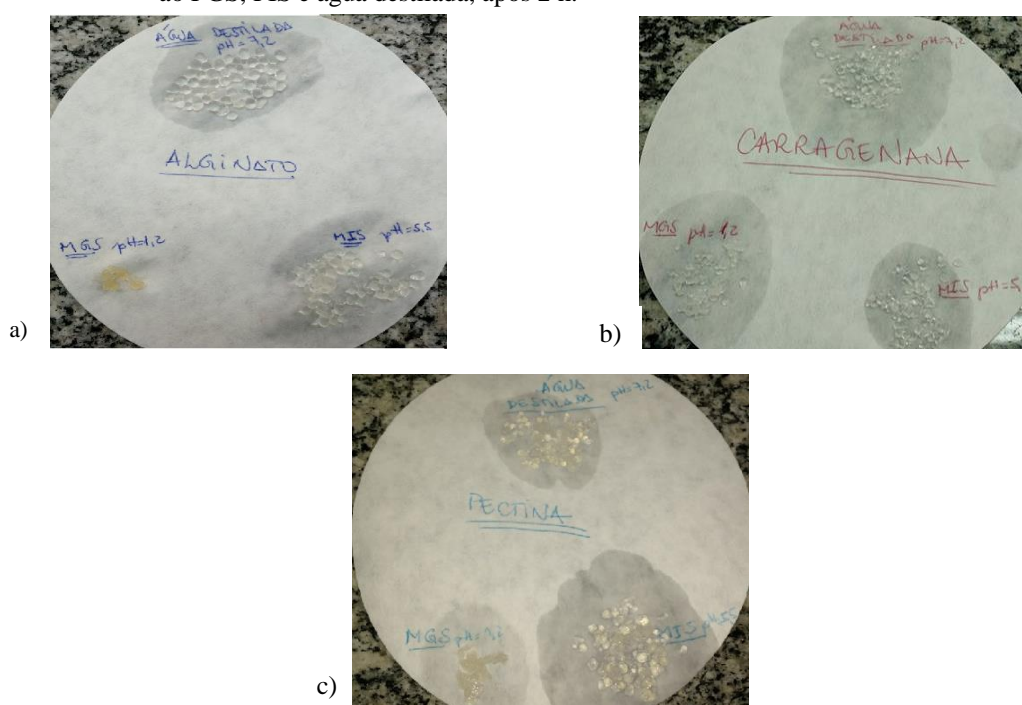
Ainda foi testado o intumescimento dos hidrogéis em água destilada, sendo que neste meio os hidrogéis de alginato e carragenana apresentaram maiores GI, já o hidrogel de pectina apresentou um GI menor quando comparado ao GI obtido em FIS (TABELA 10, FIGURA 17).

Tabela 10 – Dados obtidos no teste de GI.

		$m_{t_0}$ (g)	$m_{t_f}$ (g)	GI (%)
<b>Fluido Gástrico Simulado</b> (pH=1,2)	<b>Alginato</b>	0,051 ± 0,002	0,073 ± 0,001	42,253 ± 2,319
	<b>Carragenana</b>	0,054 ± 0,002	0,182 ± 0,003	239,524 ± 13,259
	<b>Pectina</b>	0,052 ± 0,003	0,116 ± 0,002	123,575 ± 14,751
<b>Fluido Intestinal Simulado</b> (pH=5,5)	<b>Alginato</b>	0,050 ± 0,001	0,839 ± 0,001	1.578,421 ± 31,575
	<b>Carragenana</b>	0,056 ± 0,001	0,249 ± 0,002	344,780 ± 11,516
	<b>Pectina</b>	0,053 ± 0,003	0,997 ± 0,002	1.785,306 ± 110,666
<b>Água destilada</b> (pH=7,2)	<b>Alginato</b>	0,054 ± 0,003	1,16 ± 0,01	2.052,279 ± 88,675
	<b>Carragenana</b>	0,053 ± 0,002	0,681 ± 0,007	1.177,863 ± 38,192
	<b>Pectina</b>	0,051 ± 0,001	0,63 ± 0,01	1.127,523 ± 7,539

Fonte: Do autor.

Figura 17 – Fotografias dos hidrogéis de (a) alginato, (b) carragenana e (c) pectina, submetidos ao FGS, FIS e água destilada, após 2 h.



Fonte: Do autor.

### 5.2.6 Perfil de Intumescimento dos Hidrogéis

Assim como no teste do GI, as condições empregadas para a verificação do equilíbrio de intumescimento tiveram como objetivo simular as condições do organismo humano. Após verificar o grau de intumescimento dos hidrogéis, separadamente, no FGS, FIS e em água destilada, surgiu uma curiosidade em saber se os hidrogéis comportariam da mesma maneira quando submetidos, de forma sequencial ao FGS, e posteriormente, ao FIS, a fim de simular a situação real em que esses materiais deveriam atuar.

Ao submeter os hidrogéis ao FGS, por duas horas, foi possível perceber que o hidrogel de alginato foi o que apresentou menor intumescimento quando comparado aos demais hidrogéis (Figuras 18 e 19), ocorrendo até os primeiros 15 min de ensaio, e mantendo-se estável por todo o tempo que permaneceu nesse meio. Já os hidrogéis de carragenana e pectina apresentaram intumescimento até os primeiros 30 min de ensaio, mantendo certa estabilidade durante o tempo em que permaneceram no FGS. Esta primeira etapa do perfil de intumescimento, confirmou os dados obtidos no teste de GI, mostrando que o alginato se destacou em relação aos demais, pelo baixo intumescimento que sofreu, devido à uma pequena expansão da matriz polimérica responsável por modificar o mínimo possível a porosidade da matriz, fato desejável para manter o confinamento enzimático.

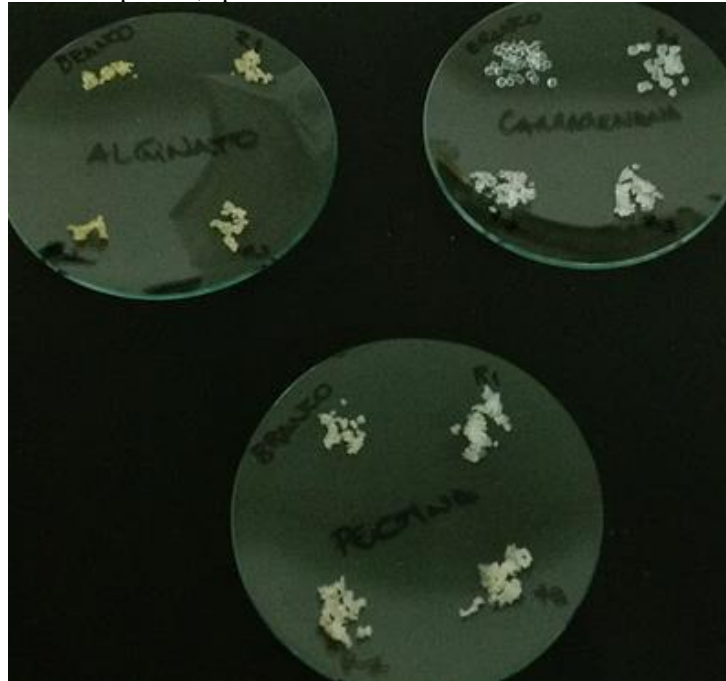
Ao trocar o FGS pelo FIS, o hidrogel de alginato apresentou grande intumescimento nos próximos 20 min e após esse tempo começou a sofrer redução de massa devido a solubilização do hidrogel no meio. O hidrogel de pectina apresentou um pequeno intumescimento nos próximos 10 min de ensaio, e posterior solubilização, enquanto a carragenana já iniciou um processo de solubilização sem intumescimento (FIGURA 19). De acordo com o teste de GI esperávamos que as matrizes poliméricas sofressem grande intumescimento, o que seria desejável no FIS a fim de promover a liberação das enzimas, em até 45 min (BRASIL, 2010), devido a expansão das matrizes poliméricas, e conseqüentemente, aumento da porosidade dessas. Porém, ao submeter os hidrogéis, de forma sequencial, ao FIS verificamos a solubilização das matrizes poliméricas, fato capaz de favorecer ainda mais o processo de liberação da pancreatina, que ocorreu num tempo máximo de 40 min. O hidrogel de pectina ofereceu desvios muito grandes, desfavorecendo ainda mais a sua eficiência.

Com a construção do perfil de intumescimento foi possível perceber que, mesmo não sendo desejável, ocorreu o intumescimento dos hidrogéis em meio ácido. Esse intumescimento

foi, relativamente, menor do que em FIS, porém, as enzimas liberadas nesse processo podem ter suas atividades comprometidas.

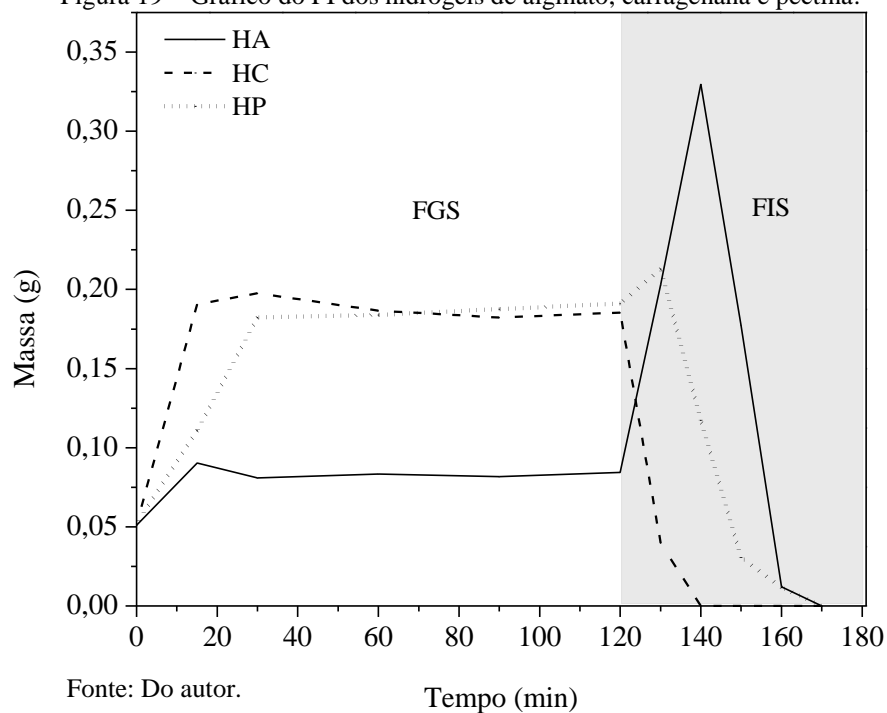
Após as análises de caracterização dos hidrogéis preparados foram realizados estudos de liberação da pancreatina.

Figura 18 – Grau de intumescimento dos hidrogéis de alginato, carragenana e pectina, após 2 h em FGS.



Fonte: Do autor.

Figura 19 – Gráfico do PI dos hidrogéis de alginato, carragenana e pectina.



Fonte: Do autor.

### 5.2.7 Estudos de Liberação da Pancreatina

Os estudos de liberação da pancreatina dos diferentes hidrogéis foram realizados a partir de adequações de metodologias empregadas para avaliar a liberação de fármacos que possuem revestimento entérico, ou seja, a mesma função esperada para os hidrogéis preparados. Com o objetivo de simular o fluido gástrico foi utilizada uma solução HCl 0,1 M pH 1,2 e para o fluido intestinal empregou-se uma solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 5,5. O pH determinado para liberação foi selecionado a partir de dados da literatura, tanto o estudo realizado por Aloulou et al. (2007) quanto a patente de Venkatwsh et al. (2014), que indicavam o pH=5,5 como o ideal para liberação da pancreatina no intestino, uma vez que o objetivo desse trabalho foi tentar obter um material que capaz de proteger a pancreatina do meio estomacal, extremamente ácido, para que chegasse ao local de ação com atividade enzimática preservada.

A liberação de pancreatina ocorreu por dois mecanismos: o primeiro, pela difusão das enzimas através dos poros das redes poliméricas, e depois pela degradação destas (ANDRESSEN et al., 1977; GEORGE, ABRAHAM, 2006). Para a liberação retardada de enzimas, a degradação da rede do hidrogel pode ser o vantajoso, uma vez que pode resultar na liberação rápida destas proteínas. Os resultados encontrados no estudo de liberação confirmaram os dados obtidos na construção dos perfis de intumescimento.

Os polímeros aniônicos funcionam como resinas de troca iônica mantendo o valor de pH constante dentro da rede polimérica durante um certo período e contribuindo para o aumento da estabilidade das enzimas encapsuladas, evitando a sua desnaturação ou degradação enzimática dependente do pH. Os hidrogéis ionotrópicos quando hidratados podem manter o pH em torno de 7,0, mesmo num meio gástrico, protegendo assim as proteínas encapsuladas da degradação (BERNKOP-SCHNURCH, 2002).

A liberação enzimática dos hidrogéis foi expressa em U acumulado de cada enzima por tempo (min). Vale ressaltar que a eficiência de encapsulação foi diferente para cada um dos hidrogéis, contribuindo liberações de diferentes valores máximos. Outro ponto importante é que para o teste de liberação foram utilizadas amostras de 200 mg de cada hidrogel, e não a massa total preparada, devido a necessidade de realizar de todo o processo de caracterização e estudos de liberação da pancreatina em triplicata, e ainda, houvessem amostras suficientes para repetir qualquer etapa se necessário. Quanto ao Creon<sup>®</sup>, também não foi utilizado todo o conteúdo presente nas cápsulas para cada replicata, e sim 200 mg de minimicroesferas, a fim de manter a mesma massa de materiais para posteriores comparações.

### 5.2.7.1 Comparação entre os Hidrogéis

Ao avaliar a liberação da  $\alpha$ -amilase (FIGURA 20a) em FGS, o hidrogel de alginato apresentou menor liberação (75,5 U que corresponde a 25%), quando comparado aos hidrogéis de carragenana (127,6 U que corresponde a 40%) e pectina (117,04 U que corresponde a 50%), logo o hidrogel de alginato apresentou maior estabilidade no ambiente gástrico simulado que os demais hidrogéis. No FIS, o hidrogel de carragenana apresentou uma liberação ligeiramente superior ao hidrogel de alginato (317,3 U em 20 min e 363,4 U em 40 min, respectivamente), enquanto que o hidrogel de pectina liberou apenas 258,6 U em 50 min (FIGURA 20a). Com isso, é possível afirmar que o hidrogel de alginato apresentou liberação maior e mais rápida de  $\alpha$ -amilase do que os outros hidrogéis.

Em relação à liberação de protease em FGS, o hidrogel de carragenana apresentou maior liberação (13.135,3 U) quando comparado aos hidrogéis de alginato (312,1 U) e pectina (6,293,5 U), com isso é possível afirmar que o hidrogel de alginato apresentou maior estabilidade no ambiente gástrico. Em presença de FIS, o hidrogel de carragenana também apresentou maior liberação de protease (34.519,5 U em 50 min), o hidrogel de alginato apresentou a segunda melhor liberação correspondente à metade da liberação de protease pelo hidrogel de carragenana, enquanto o hidrogel de pectina apresentou menor liberação de protease, correspondente a menos de um terço da liberação realizada pelo hidrogel de carragenana, ambos em 40 min (FIGURA 20b). A liberação de protease mais elevada pelos hidrogéis de carragenana e alginato confirmou os dados obtidos no teste EE e na análise do perfil de intumescimento, uma vez que o hidrogel de carragenana apresentou maior EE do que o hidrogel de alginato e ambos os hidrogéis terem liberado por completo a enzima devido à solubilização de suas matrizes em presença de FIS.

O hidrogel de alginato apresentou liberação de lipase mais baixa (152,1 U) em FGS e a maior liberação (7.673,3 U em 30 min) em FIS, quando comparado aos hidrogéis de carragenana e pectina. Com isso, é possível notar que o alginato foi o melhor hidrogel para manter a atividade da lipase, pois apresentou maior estabilidade em FGS e maior liberação de lipase em FIS. Já o hidrogel de pectina apresentou liberação enzimática em meio gástrico quase 2,5 vezes maior do que o hidrogel de alginato (362 U), enquanto o hidrogel de carragenana libertou 528,6 U. Em FIS, o hidrogel de carragenana libertou 4.074,8 U em 20 min e o hidrogel de pectina liberou 2.082,8 U em 30 min. Embora a liberação de lipase pelo hidrogel de carragenana fosse maior do que o hidrogel de pectina, ao analisar a liberação de lipase total de

todos os hidrogéis, foi possível notar que o hidrogel de carragenana liberou cerca de um oitavo, enquanto o hidrogel de pectina quase um sexto da quantidade liberada pelo hidrogel de alginato (FIGURA 20 c). A maior liberação de lipase pelos hidrogéis de alginato e carragenana confirmou os dados obtidos nos teste eficiência de encapsulação e perfil de intumescimento, uma vez que o hidrogel de alginato apresentou maior eficiência de encapsulação do que o hidrogel de carragenana, embora ambos os hidrogéis tenham obtido liberação completa devido à solubilização das matrizes em presença de FIS .

Após a realização do estudo de liberação da pancreatina pelos hidrogéis preparados, percebeu-se que todos os hidrogéis apresentaram liberação em FGS, por menor que tenha sido. Isso aconteceu, porque houve um pequeno intumescimento dos hidrogéis em meio gástrico simulado, permitindo que uma pequena liberação ocorresse. Esta liberação é conhecida como *burst release*, ou seja, uma liberação rápida que ocorre até que os hidrogéis alcançassem um equilíbrio de intumescimento no meio que se encontravam (GUPTA; JABRAIL, 2006).

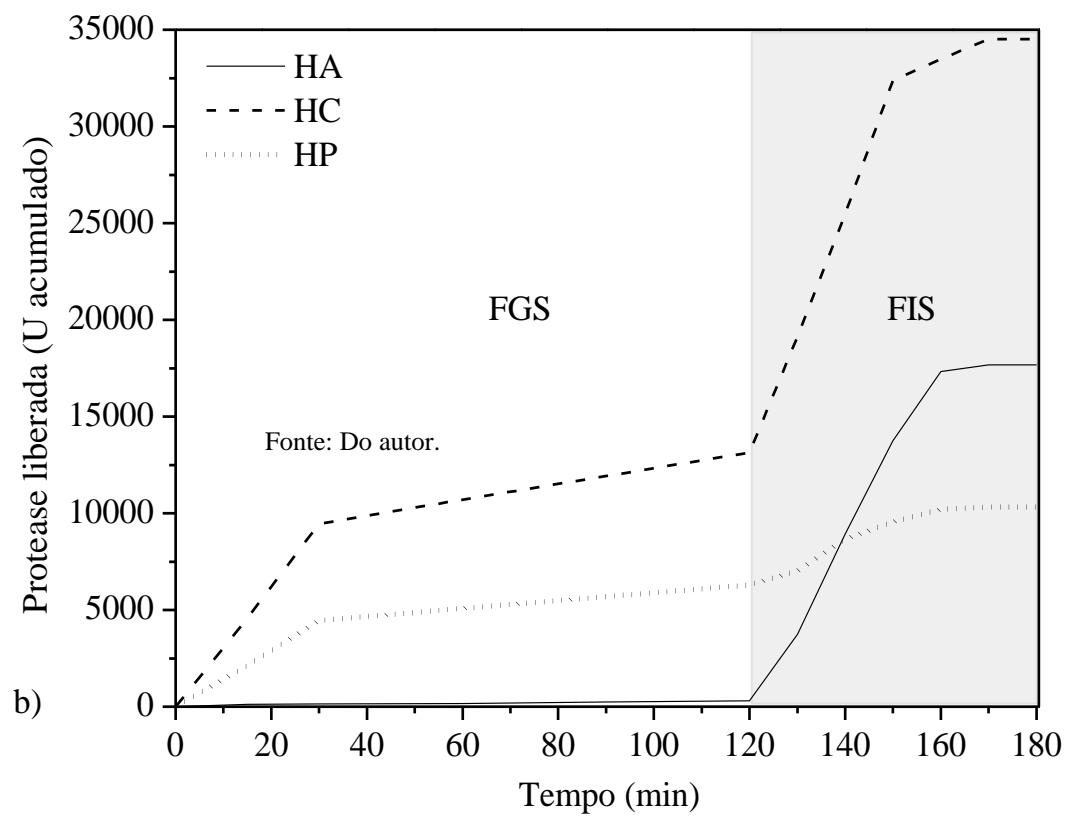
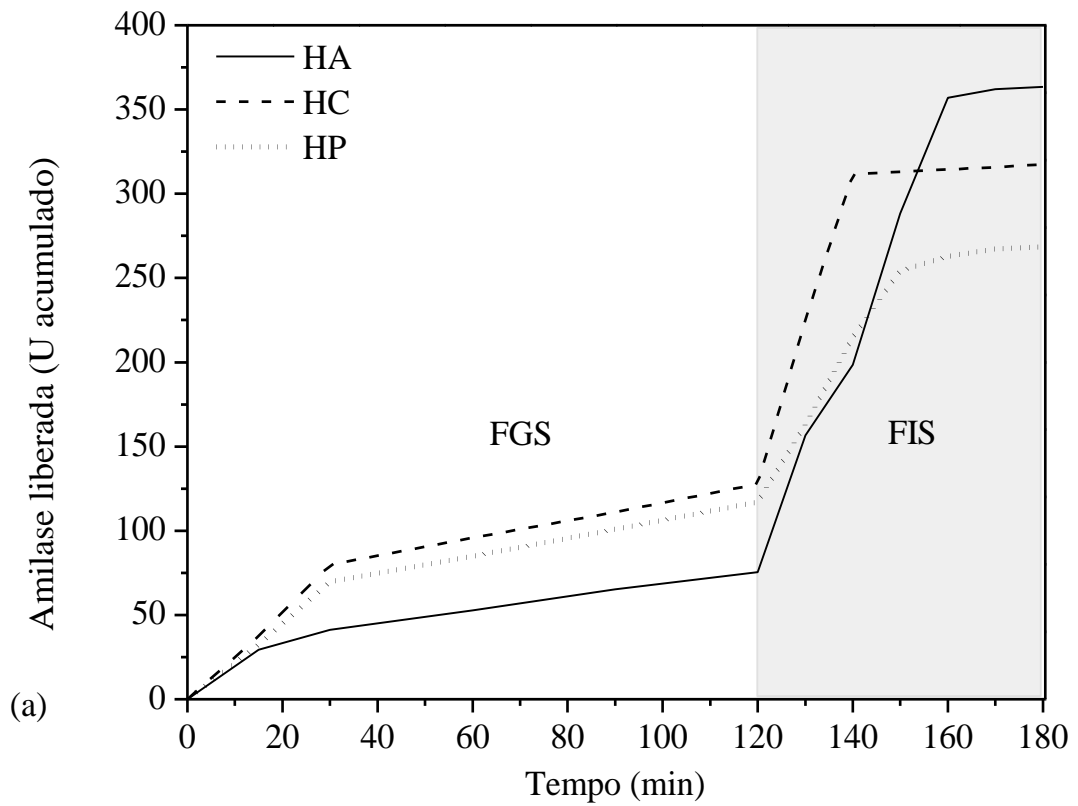
A partir dos estudos de liberação da pancreatina, também, houve a tentativa de confirmar os dados obtidos pela encapsulação das enzimas, expressos em atividade por mg de hidrogel produzido. Porém, as atividades encontradas após o estudo de liberação apresentaram-se maiores que os dados obtidos na EE, da ordem de 100 vezes maior para atividades de  $\alpha$ -amilase e lipase e de 10 vezes para protease (TABELA 11). Esse aumento de atividade pode estar relacionado à presença de íons presentes na reticulação das matrizes poliméricas formadas, como por exemplo, íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Cl}^{-1}$  que podem atuar como ativador alostérico e estabilizante das estruturas terciárias e secundárias das moléculas das enzimas (WHITCOMB; LOWE, 2013). Assim, os materiais preparados não só foram eficientes na preservação das atividades enzimáticas, mas também ativaram as enzimas e promoveram a liberação em pH propício para obter uma ação melhor. Na literatura, não foram encontrados estudos sobre a encapsulação de pancreatina por hidrogéis e a sua liberação com aplicações farmacêuticas.

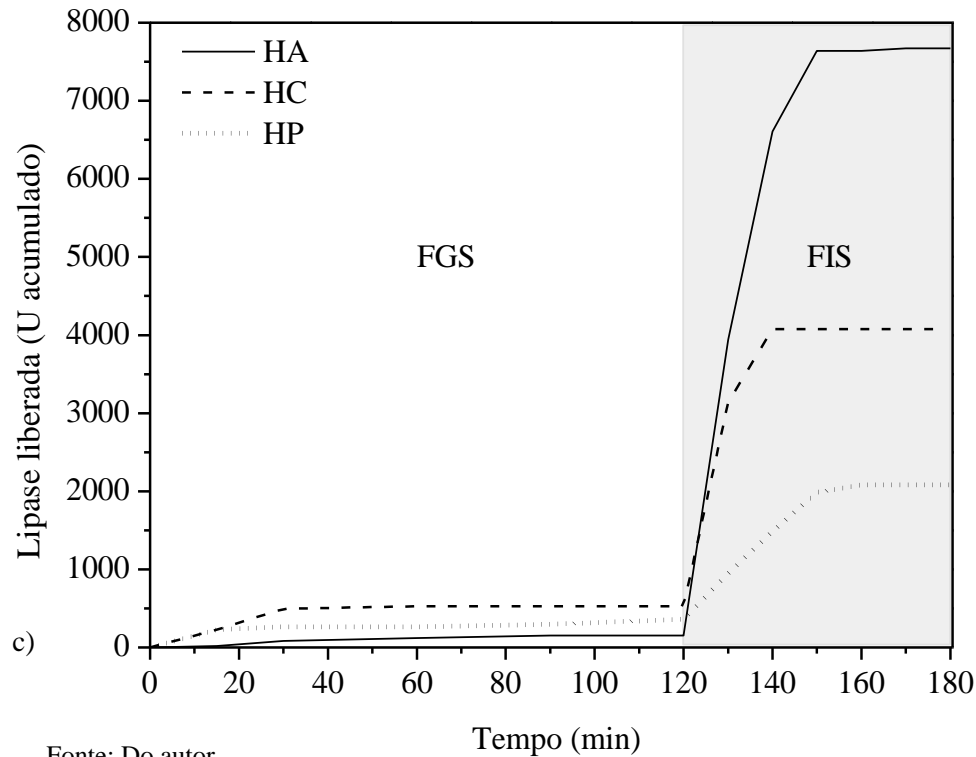
Tabela 11 - Atividade enzimática apresentada pelos diferentes hidrogéis nos testes de eficiência de encapsulação (EE) e estudos de liberação (EL) da pancreatina, considerando massas de 200 mg.

	$\alpha$ -amilase		Protease		Lipase	
	EE	EL	EE	EL	EE	EL
<b>Alginato</b>	3,64 U	363 U	1.768 U	17.673 U	77,0 U	7.673U
<b>Carragenana</b>	3,18 U	317 U	3.456 U	34.520 U	40,8 U	4.075 U
<b>Pectina</b>	2,70 U	268 U	1.042 U	10.319 U	21,2 U	2.083 U

Fonte: Do autor.

Figura 20 – Comparação da liberação de amilase (a), protease (b) e lipase (c) pelos hidrogéis de alginato, carragenana e pectina.





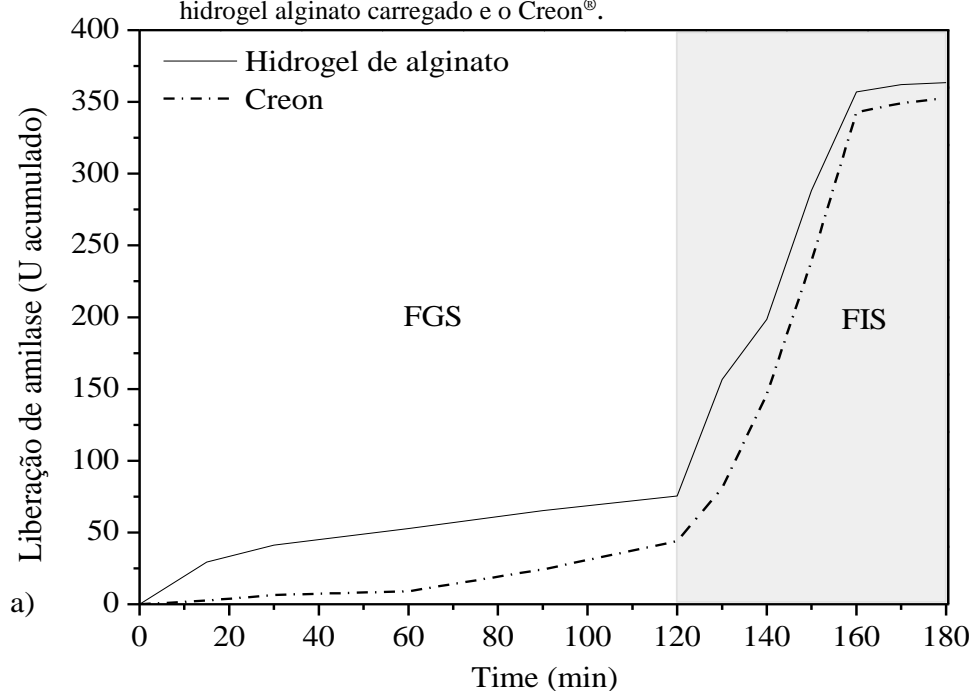
### 5.2.7.2 Comparação entre o Hidrogel de Alginato e o Creon®

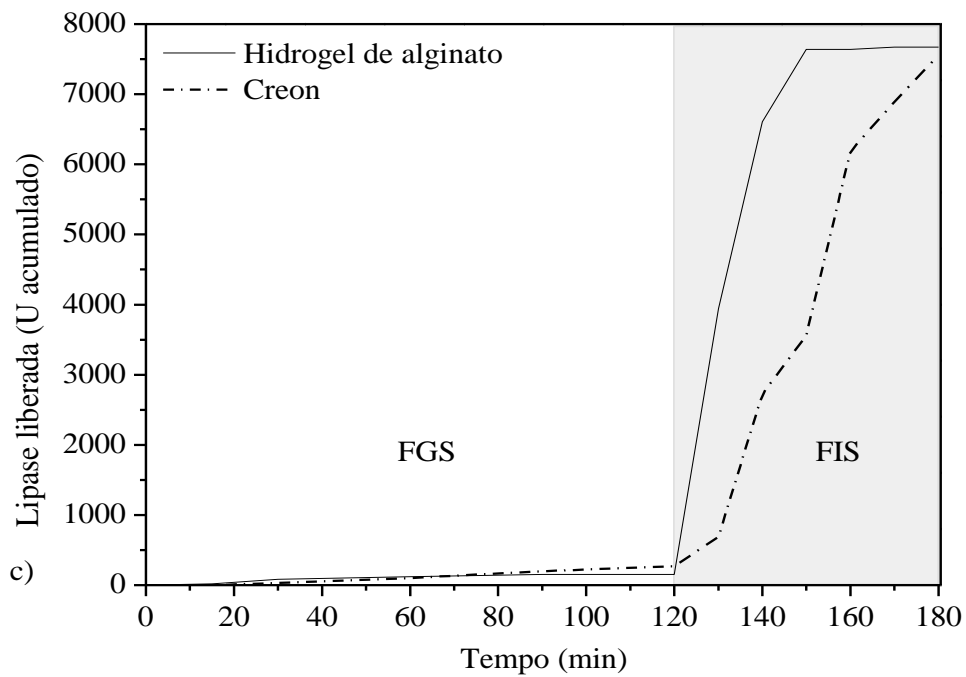
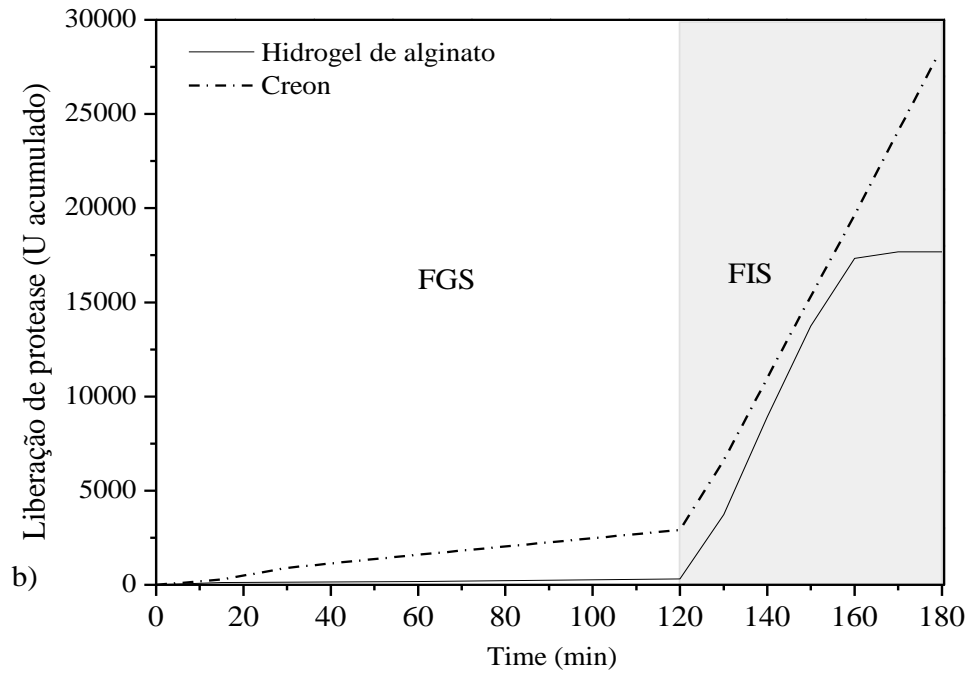
A massa média do conteúdo das cápsulas do Creon® foi de  $0,2557 \pm 0,0002$  g, sendo informado pelo fabricante que cada cápsula contém 33.200 U de amilase, 37.500 U de protease e 10.000 U de lipase. Como o estudo de liberação das enzimas foi realizado nas mesmas condições utilizadas para a liberação da pancreatina nos diferentes hidrogéis preparados, neste teste foram empregadas massas de 200 mg do conteúdo de três cápsulas diferentes, para compor a triplicata, de forma que essa massa seria correspondente a, aproximadamente, 26.039 U amilase, 29.412 U protease e 7.843 U lipase. Uma vez que o hidrogel de alginato foi o que apresentou maior eficiência de encapsulação da pancreatina, menor intumescimento em FGS, e conseqüentemente, menor liberação de todas as enzimas nesse meio, e ainda, apresentou maior intumescimento em FIS seguido de solubilização total da matriz polimérica, resultando em maior liberação das enzimas encapsuladas, este foi o hidrogel de escolha para comparação com dados obtidos no estudo de liberação da pancreatina de uma formulação comercialmente disponível, o Creon®.

Ao comparar a liberação de  $\alpha$ -amilase (FIGURA 21a) no FGS, o Creon® apresentou maior estabilidade e menor liberação enzimática que o hidrogel de alginato (43,9 e 75,5 U,

respectivamente), entretanto em FIS, as enzimas liberadas por ambos apresentaram atividades próximas (363,4 e 352,9 U, respectivamente) em aproximadamente 40 min. O Creon<sup>®</sup> apresentou atividade muito abaixo da atividade teórica esperada. A figura 21b mostra a liberação de protease, em que o hidrogel de alginato apresentou maior estabilidade que o Creon<sup>®</sup> no FGS, liberando menos protease (312,1 e 2.906,4 U, respectivamente). No FIS, embora o Creon<sup>®</sup> tenha apresentado atividade proteolítica mais alta que o hidrogel de alginato, o gráfico mostra que sua liberação não foi completa, e isso ocorreu porque suas esferas permaneceram no meio após o término da análise. A liberação de protease pelo hidrogel de alginato se concluiu em 40 min com a solubilização total da matriz polimérica. De acordo com as informações técnicas, o revestimento do Creon<sup>®</sup> solubiliza-se em pH 6,8, porém, pacientes que apresentam distúrbios pancreáticos apresentam redução na liberação de bicarbonato no organismo, levando à uma liberação enzimática tardia, de acordo com Kopelman et al. (1988), e conseqüentemente, gera a ineficiência desses sistemas, porque quanto menor é o contato das enzimas com o quimo, menor é a hidrólise das moléculas de proteínas. Com relação à liberação de lipase no FGS, tanto o hidrogel de alginato como o Creon<sup>®</sup> apresentaram comportamentos semelhantes e liberação de lipase mínima. Embora a liberação de lipase pelo hidrogel de alginato e pelo Creon<sup>®</sup> tenham sido similares em FIS, a liberação de enzima pelo hidrogel foi completa e mais rápida, ocorrendo em 30 min, enquanto a liberação pelo Creon<sup>®</sup> não foi concluída (FIGURA 21c).

Figura 21 – Comparação da liberação de amilase (a), protease (b) e lipase (c) pelo hidrogel alginato carregado e o Creon<sup>®</sup>.





Fonte: Do autor.

Ambas formulações apresentaram *burst release*, porém a enzima mais afetada no caso do hidrogel de alginato foi a  $\alpha$ -amilase, enquanto para o Creon<sup>®</sup> tanto a  $\alpha$ -amilase quanto a protease.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo confirma que a técnica de encapsulação enzimática por meio de hidrogéis é eficiente tanto na preservação da atividade da pancreatina em meio gástrico simulado quanto na liberação em enzimática em meio intestinal simulado (pH similar a região do duodeno). Esta técnica se mostrou ainda ser capaz de promover uma ativação das enzimas liberadas resultando em atividade maior do que era esperado.

O hidrogel de alginato quando comparado aos demais hidrogéis apresentou maior EE de amilase (18%) e lipase (68%), e a segunda melhor EE para protease (53%). No teste de GI foi o hidrogel responsável pelo menor intumescimento em meio ácido (42%) e o segundo maior em meio intestinal (1.578%). Ao analisar os perfis de intumescimento foi o que apresentou maior equilíbrio em meio gástrico, além de um menor intumescimento, e em meio intestinal proporcionou maior intumescimento seguido da solubilização da matriz. Todos os testes realizados nos estudos de liberação das enzimas pancreáticas confirmaram os dados encontrados nos testes realizados anteriormente. Com isso, o baixo grau de intumescimento foi preditivo com relação à baixa liberação enzimática em meio gástrico (menor *burst release*), permitindo a preservação das atividades enzimáticas. Enquanto, o alto grau de intumescimento e a solubilização da matriz foram responsáveis pela maior liberação de amilase (40 min) e lipase (30 min), enzimas de melhores EE. Diante disso, foi o hidrogel selecionado para ser comparado ao Creon<sup>®</sup>.

Já o Creon<sup>®</sup> foi submetido aos estudos de liberação das enzimas pancreáticas nas mesmas condições simuladas para os hidrogéis, porém suas esferas não apresentaram total solubilização, comprometendo a liberação das enzimas. Em relação a amilase, o Creon<sup>®</sup> exibiu melhor comportamento em meio gástrico quando comparado ao hidrogel de alginato, embora tenham apresentado liberações muito próximas em mesmo tempo. Quanto à protease, o comportamento do Creon<sup>®</sup> foi pior, tanto em meio gástrico quanto em meio intestinal, de forma que a sua liberação nem foi concluída. Já para a lipase, o comportamento do Creon<sup>®</sup> e do hidrogel foi semelhante, embora em meio intestinal a liberação pelo hidrogel tenha sido completa em 30 min enquanto o Creon<sup>®</sup> não foi capaz de concluir a liberação no período de análise. Desta forma o hidrogel de alginato mostrou-se capaz de proporcionar liberação enzimática de forma mais eficiente e mais rápida em meio intestinal simulado quando comparado ao Creon<sup>®</sup>.

Logo, a utilização de polímeros naturais merece mais atenção, uma vez que é capaz de proporcionar maior estabilidade aos produtos biofarmacêuticos e apresenta como vantagens a utilização de técnicas simples e de baixo custo para a preparação das esferas. O processo de revestimento, além de apresentar maior custo, requer vários excipientes de diferentes funcionalidades como, agentes de revestimento, plastificantes, estabilizantes, solventes, dentre outros, além dos excipientes já utilizados na obtenção de formas farmacêuticas de administração oral, como agentes lubrificantes, aglutinantes, solubilizantes, etc., o que pode resultar num aumento das interações excipiente-excipiente e excipiente-biofármaco. Com isso, o hidrogel de alginato se mostrou uma alternativa apropriada para substituir a formulação, comercialmente disponível, que contém enzimas pancreáticas.

## REFERÊNCIAS

ALLEN JR., L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ALOULOU, A. et al. In vitro comparative study of three pancreatic enzyme preparations: dissolution profiles, active enzyme release and acid stability. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 27, p. 283–292, 2008.

ANDERSON, N. S. The masked repeating structures of lambda and mu-carrageenans. **Carbohydrate Research**, v. 7, p. 468–473, 1968.

ANDRESSEN, I. L. et al. Some biological functions of matrix components in benthic algae in relation to their chemistry and the composition of seawater. **ACS Symposium Series**, v. 48, p. 361–381. 1977.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **RDC Nº 55**: Dispõe sobre os detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde com indicação para limpeza de dispositivos médicos e dá outras providências, **2012**.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**, 2. ed, v. 1. Amsterdam: Elsevier/Academic Press. 2004.

BERNKOP-SCHNURCH, A. **Mucoadhesive polymers**. In: *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded*. Marcel Dekker Inc., New York, p. 147–162. 2002.

BHARDWAJ, T. R.; KANWAR, M.; LAL, R.; GUPTA, A. Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, p. 1025–1038, 2000.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Q. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 62, n. 1, p. 83-99, 2010.

BHUSHAN, I.; PARSHAD, R.; QAZI, G. N. Immobilization of Lipase by Entrapment in Calcium Alginate Beads. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 23, n. 6, p. 552–562, 2008.

BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular basis of Ca<sup>2+</sup>-induced gelation in alginates and pectins: the eggbox model revisited. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 1089–1096, 2001.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**, 5ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

CAMPO, V. L. et al. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 167–180, 2009.

CAREY, N. H. Production and use of therapeutic agents. **British Medical Journal** (Clinical research ed.), v. 10, n. 295, p. 907-8, 1987.

CARREIRA, A. C. O. et al. Biofármacos: sua importância e as técnicas utilizadas em sua produção. **Genética na escola**, v. 8, n. 2, p. 168-177, 2013.

CARRIÈRE, F. et al. Quantitative study of digestive enzyme secretion and gastrointestinal lipolysis in chronic pancreatitis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**. v. 3, p. 28–38, 2005.

CERQUEIRA, M. A. et al. Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 179 -185, 2011.

CHARNEY J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, n. 2, p. 501–505, 1947.

CREON® 10,000 technical information from **Abbott Laboratories GmbH**. Disponível em: <[http://dam.abbott.com/pt-br/documents/pdfs/nossas-bulas/C/BU%2032\\_Creon\\_profissional.pdf](http://dam.abbott.com/pt-br/documents/pdfs/nossas-bulas/C/BU%2032_Creon_profissional.pdf)>. Acesso em: 20 Fev. 2016.

CHOURASIA, M. K.; JAIN, S. K. Polysaccharides for colon targeted drug delivery. **Drug Delivery**, v. 11, n. 2, p. 129-148, 2004.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e caracterização de sistemas de liberação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. 2010. Tese (doutorado em Engenharia Química) -Universidade de Coimbra. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Coimbra. 2010.

COLLETT, J.; MORETON, C. Formas Farmacêuticas Perorais de Liberação Modificada. In: AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

DANIEL-DA-SILVA, A. L. et al. Synthesis and swelling behavior of temperature responsive kappa-carrageenan nanogels. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 355, n. 2, p. 512–517, 2011.

DE CASTRO, H. F. et al. In: **Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicação e mercado**. BON, E. P. S. et al.; Interciência: Rio de Janeiro, 2008, cap. 6.

DEYOUNG J. L. Development of pancreatic enzyme microsphere technology and US findings with pancrease in the treatment of chronic pancreatitis. **International Journal of Pancreatology**, v. 5(Suppl.), p. 31–36, 1989.

DIMAGNO, E. P. et al. Fate of orally ingested enzymes in pancreatic insufficiency. Comparison of two dosage schedules. **New England Journal of Medicine**, v. 296, p. 1318–1322, 1977.

DIMAGNO, E. P. Gastric acid suppression and treatment of severe exocrine pancreatic insufficiency. **Best Practice Research Clinical Gastroenterology**, v. 15, p. 477–86, 2001.

DINI, C.; ISLAN, G. A.; CASTRO, G. R. Characterization and Stability Analysis of Biopolymeric Matrices Designed for Phage-Controlled Release. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 174, p. 2031–2047, 2014.

EDGINGTON, L. E.; VERDOES, M.; BOGYO, M. Functional imaging of proteases: recent advances in the design and application of substrate-based and activity-based probes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, p. 798–805, 2011.

ELSUPIKHE, R. F. et al. Green sonochemical synthesis of silver nanoparticles at varying concentrations of  $\kappa$ -carrageenan. **Nanoscience Research Letters**, v. 10, n. 302, p. 1-8, 2015.

*FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA*. Federal Register Notice. 2004. Disponível em: < <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2004-04-28/pdf/04-9652.pdf>>. Acesso em: 22 Abr. 2015.

*FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA*. Guidance for Industry Exocrine Pancreatic Insufficiency Drug Products – Submitting NDAs. 2006. Disponível em: < Guidance for Industry Exocrine Pancreatic Insufficiency Drug Products – Submitting NDAs>. Acesso em: 22 Abr. 2015.

FERRAZ, M. P. et al. Effect of chemical composition on hydrophobicity and zeta-potencial of plasma sprayed HA/ CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glass coatings. **Biomaterial**, v. 22, p. 3105-3112, 2001.

FERNANDES, M. F. M.; FILGUEIRAS, C. A. L. Um panorama da nanotecnologia no Brasil (e seus macro-desafios). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2205-2213, 2008.

FERREIRA, A. O. **Guia prático de farmácia magistral**. São Paulo: Pharmabooks, 2002.

FUNAMI, T. et al. Influence of molecular structure imaged with atomic force microscopy on the rheological behavior of carrageenan aqueous systems in the presence or absence of cations. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 617–629, 2007.

FUNDUEANU, G. et al. Preparation and characterization of Ca-alginate microspheres by a new emulsification method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 170, p. 11-21, 1998.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 1-14, 2006.

GILL, I. Biodopednanocomposite polymers: Sol-gel bioencapsulates. **Chemistry of Materials**. v. 13, p. 3404–3421, 2001.

GRAHAM, N. B. Controlled drug delivery systems. **Chemistry and Industry**. v. 15, p. 482, 1990.

GUARNER, L. et al. Fate of oral enzymes in pancreatic insufficiency. **Gut**. v. 34, p. 708–712, 1993.

GUPTA, M. N. Thermostabilization of proteins. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v. 14, p. 1–11, 1991.

GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**. v. 66, p. 43–54, 2006.

GUPTA, S. **Influence of Divalent Ions on Gelatin Hydrogel and its Physicochemical Characterization**, Thesis (Master of Technology). National Institute of Technology Rourkela, Department of Biotechnology and Medical Engineering, Odisha, 2015.

HAN, M. R. et al. pH-dependent release property of alginate beads containing calcium carbonate particles. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n. 8, p. 787-796, 2007.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization. **Chemistry Society Review**, v. 38, p. 453-468, 2009.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 54, p. 3-12, 2002.

*ICH. Expert Working Group, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), ICHHT-ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005.*

IMESON, A. P. Carrageenan. In: G. O. PHILLIPS; P. A. WILLIAMS (Eds.), **Handbook of hydrocolloids** (pp. 87–102). Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited. 2000.

JAYAKUMAR, R. et al. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v. 55, n. 7, p. 675-709, 2010.

JORGENSEN, L. et al. Preparing and evaluating delivery systems for proteins. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 3-4, p. 174-182, 2006.

KANWAR, S. S. et al. Methods for inhibitions of residual lipase activity in colorimetric assay: A comparative study. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 42 p. 233-237, 2005.

KIENER, P. Entrevista. **Nature Drug Discovery**. v. 8, p. 532, 2009.

KIM, W. T. et al. Characterization of calcium alginate and chitosan-treated calcium alginate gel beads entrapping allyl isothiocyanate. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 566-573, 2008.

KOPELMAN, H. Impaired chloride secretion, as well as bicarbonate secretion, underlies the fluid secretory defect in the cystic fibrosis pancreas. **Gastroenterology**, v. 95, p. 349–55; 1988.

KUMAR, M. N. V. R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 234-258, 2000.

LAUWERS A.; RUYSSSEN R. Determination of trypsin, chymotrypsin and elastase in pancreatin. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 23, n. 5, p. 295–306, 1968.

LEE, C. H.; BAE, Y. C. Effect of Salt on Swelling Behaviors of Thermosensitive Hydrogels: Applicability of the Nonrandom Contact Model. **Macromolecules**, v. 48, p. 4063–4072, 2015.

LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B. The biopharmaceutics classification system. In: TAYLOR, J. B.; TRIGGLE, D. J. (Eds.). **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. v. 5, p. 971–988, 2007.

LEONG, K. H. et al. Carboxymethylation of kappa-carrageenan for intestinal-targeted delivery of bioactive macromolecules. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1507–1515, 2011.

LEONG, K. H. et al. Lectin-functionalized carboxymethylated kappa-carrageenan micro-particles for oral insulin delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 555–565, 2011.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 143-154, 2005.

LORENZO, C. A. et al. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 9, p. 1148-1171, 2013.

LOTTERMANN, M. T. **Purificação e caracterização estrutural de uma  $\alpha$ -amilase de *Cryptococcus flavus* expressa em *Saccharomyces cerevisiae* “MFL”**. 2012. 92 f. Dissertação Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Brasília, Brasília. 2012.

LUCAS, C. M. **Estudos das propriedades elétricas de filmes finos de alginato de sódio com  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$  e  $\text{Cr}^{+3}$** . 2007. Dissertação (mestrado em química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-graduação em Química, Natal, 2007.

MARCEL, P. In: BARRETO, R. M. **Ideias sobre ideias: mais de 500 pensamentos inspiradores sobre criatividade**. 1. ed. São Paulo: Summus, 2014. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=V31uBAAAQBAJ&pg=PT18&lpg=PT18&dq=%E2%80%9C+A+verdadeira+viagem+de+descobrimento+n%C3%A3o+consiste+em+procurar+novas+paisagens,+mas+em+ter+novos+olhos.+%E2%80%9D+Marcel+Proust+refer%C3%A2ncia&source=bl&ots=inaj4xzQEJ&sig=lypeamV6F6l86rq-04ax43oHgg4&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwiB5uuo6pLVAhVBJ5AKHf3ABkAQ6AEIQzAI#v=onepage&q=%E2%80%9C%20A%20verdadeira%20viagem%20de%20descobrimento%20n%C3%A3o%20>>

20consiste%20em%20procurar%20novas%20paisagens%2C%20mas%20em%20ter%20novo  
s%20olhos.%20E2%80%9D%20Marcel%20Proust%20refer%C3%AAncia&f=false>.  
Acesso em: 27 Jan. 2017.

MARTINS, J. T. et al. Synergistic effects between k-carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. **Food hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 280-289, 2012.

MENDES, A. A. et al. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1055-1066, 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

NAKAMURA, K. et al. Oral. Oral insulin delivery using P(MAA-g-EG) hydrogels: Effects of network morphology on insulin delivery characteristics. **Journal of Controlled Release**, v. 95, p. 589-599, 2004.

NING, W. et al. The influence of citric acid on the properties of thermoplastic starch/linear low-density polyethylene blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 3, p. 446-453, 2007.

OTSUKA, H.; NAGASAKI, Y.; KATAOKA, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 403-419, 2003.

PARDONCHE, P. E. **Aplicação de extratos de algas marinhas na indústria de alimentos**. Boletim técnico CECA Produtos Químicos S/A (p. 15). São Paulo, 1985.

PAULA, H. C. B. M. et al. Esferas (beads) de alginato como agente encapsulante de óleo de croton zehntneri Pax et Hoffm. **Polímeros**, v. 20, p. 112-120, 2010.

PEPPAS, N. A. Preparation methods and structure of hydrogels. In: PEPPAS, N. A. (Ed.), **Hydrogels in Medicine and Pharmacy, Fundamentals** (p. 1-25). CRC Press. 1986.

PLASCHINA, I. G.; BRAUDO, E. E.; TOLSTOGUZOV, V. B. Circular-dichroism studies of pectin solutions. **Carbohydrate Research**, v. 60, p. 1-8, 1978.

QIU, Y., PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 49-60. 2012.

RANA, V. et al. Modified gums: Approaches and applications in drug delivery, **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1031-1047, 2011.

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.

REIS, C. P. et al. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 53- 65, 2006.

RINAUDO, M., Polyelectrolyte properties of a plant and animal polysaccharide. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 277-289, 2009.

ROKHADE, A. P. et al. Novel interpenetrating polymer network microspheres of chitosan and methylcellulose for controlled release of theophylline. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 678-687, 2007.

ROLIN, C. Commercial pectin preparations. In: **Pectins and their manipulation**, SEYMOUR, C.; KNOX, P., Eds. Blackwell: Boca Raton, p. 222-241, 2002.

ROWE, R. R.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**, 6<sup>th</sup>. Pharmaceutical Press, 2009.

RUBINSTEIN, A.; RADAI, R. In vitro and in vivo analysis of colon specificity of calcium pectinated formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 41, n. 5, p. 291-295, 1995.

RUHLMANN, A. et al. Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. Crystal structure determination and stereochemistry of the contact region. **Journal of Molecular Biology**, v. 77, p. 417-436, 1973.

SARTORI, C. et al. Determination of the cation content of alginate thin films by FTIR spectroscopy. **Polymer**, v.38, n. 1, p. 43-51, 1997.

SCHOENER, C. A.; PEPPAS, N. A. Oral delivery of chemotherapeutic agents: background and potential of drug delivery systems for colon delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 22, p. 459–468. 2013.

SCHOUBBEN, A. et al. DEVELOPMENT of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, p. 363-369, 2010.

SILVA, F. P. **Síntese e caracterização de hidrogéis de poli[(N-isopropilacrilamida)-co-(ácido metacrílico)] e sua aplicação como sistemas de liberação controlada de medicamentos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

SOARES, C. M. F. et al. Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore Silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 79, p. 745-758, 1999.

STEAD, R. J. et al. Enteric coated microspheres of pancreatin in the treatment of cystic fibrosis: comparison with a standard enteric coated preparation. **Thorax**. v. 42, p. 533–7, 1987.

TABERNERO, A. et al. Survey of supercritical fluids technics for producing drug delivery systems for a potential use in cancer therapy. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 32, n. 5, p. 507–532, 2016.

TERRA, G. P. et al. Evaluation of pancreatin stability through enzyme activity determination. **Acta Pharmaceutica**. v. 66, n. 3, p. 423 - 431, 2016.

THIMMA, R. T.; TAMMISHETTI, S. Barium Chloride Crosslinked Carboxymethyl Guar Gum Beads for Gastrointestinal Drug Delivery. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 82, p. 3084–3090, 2001.

THOMA, K.; BECHTOLD, K., Influence of aqueous coatings on the stability of enteric coated pellets and tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 47, n. 1, p. 39–50, 1999.

TILBEURGH, H. V. et al. Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex, **Nature**, v. 359, p. 59–162, 1992.

TOMÉ, L. I. N. et al. Salting-in with a Salting-out Agent: Explaining the Cation Specific Effects on the Aqueous Solubility of Amino Acids. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 20, p. 6116–6128, 2013.

*The United States Pharmacopeia Convention*. USP 32 ed. Rockville: U.S. Pharmacopeial, 2009. Pancreatin. Disponível em: <[http://www.uspbpep.com/usp32/pub/data/v32270/usp32nf27s0\\_m60270.html#usp32nf27s0\\_m60270](http://www.uspbpep.com/usp32/pub/data/v32270/usp32nf27s0_m60270.html#usp32nf27s0_m60270)>. Acesso em: 20 Abr. 2015.

\_\_\_\_\_. USP 32 ed. Rockville: U.S. Pharmacopeial, 2009. Pancreatin Tablets. Disponível em: <[http://www.uspbpep.com/usp32/pub/data/v32270/usp32nf27s0\\_m60290.html](http://www.uspbpep.com/usp32/pub/data/v32270/usp32nf27s0_m60290.html)>. Acesso em: 20 Abr. 2015.

\_\_\_\_\_. USP 32 ed. Rockville: U.S. Pharmacopeial, 2009. Apparent Intrinsic Dissolution. Disponível em: <[http://www.uspbpep.com/usp32/pub/data/v32270/usp32nf27s0\\_m60290.html](http://www.uspbpep.com/usp32/pub/data/v32270/usp32nf27s0_m60290.html)>. Acesso em: 20 Abr. 2015.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico: Histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

VENKATWSH, G. et al. **Micropellet compositions comprising pancreatin containing digestive enzyme mixture**. US 20140127307 A1. 2014. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US20140127307#legal-events>>. Acesso em: 20 Mai. 2015.

VILAMA, K. et al. Controlled silver nanoparticles synthesis in semi-hydrogel networks of poly(acrylamide) and carbohydrates: A rational methodology for antibacterial application. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 463-471, 2009.

WALLACE, J. L.; SHARKEY, K. A. Pharmacotherapy of Gastric Acidity, Peptic Ulcers, and Gastroesophageal Reflux Disease. In: BRUNTON, L. L. (Ed.) **Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics**. 12 ed. New York: McGraw-Hill, 2011.

WALSH, G. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 2, p. 135-138, 2002.

WEI, X. et al. Sigmoidal release of indomethacin from pectin matrix tablets: Effect of in situ crosslinking by calcium cations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 318, n. 1-2, p. 132-138, 2006.

WHITCOMB, D. C.; LOWE, M. E. Human Pancreatic Digestive Enzymes. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 1, p. 1-17, 2013.