

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG**

**ALINE GRAVINEZ PERISSINATO**

**FORMULAÇÕES SÓLIDAS DE LACTASE: ESTUDOS DE ESTABILIDADE  
ACELERADA, LIBERAÇÃO E SUA QUANTIFICAÇÃO POR  
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.**

**Alfenas/MG**

**2016**

**ALINE GRAVINEZ PERISSINATO**

**FORMULAÇÕES SÓLIDAS DE LACTASE: ESTUDOS DE ESTABILIDADE  
ACELERADA, LIBERAÇÃO E SUA QUANTIFICAÇÃO POR  
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.**

Trabalho apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Desenvolvimento e Análise de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan.  
Coorientadora: Profa. Dra. Jerusa Simone Garcia.

**Alfenas/MG**

**2016**

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

Perissinato, Aline Gravinez.

Formulações sólidas de lactase : estudo de estabilidade acelerada, liberação e sua quantificação por espectroscopia no infravermelho. / Aline Gravinez Perissinato. – Alfenas - MG, 2016.

78 f.

Orientador: Marcello Garcia Trevisan.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. beta-galactosidase. 2. Química Farmacêutica. 3. Quimiometria. 4. Espectroscopia infravermelho Transformada Fourier. 5. Controle de Qualidade. I. Trevisan, Marcello Garcia. II. Título.

CDD-615.19

ALINE GRAVINEZ PERISSINATO

**FORMULAÇÕES SÓLIDAS DE LACTASE: ESTUDOS DE ESTABILIDADE  
ACELERADA, LIBERAÇÃO E SUA QUANTIFICAÇÃO POR  
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.**

A banca examinadora abaixo assinada aprova o trabalho apresentado como parte dos requisitos para a aprovação da defesa do curso de mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Desenvolvimento e Análise de Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em: 21/ 01 /2016

Prof<sup>o</sup>. Dr. Marcello Garcia Trevisan

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Assinatura

Prof<sup>o</sup>. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Assinatura

Prof<sup>o</sup>. Dr. Rudy Bonfilio

Instituição: Universidade Federal do Mato Grosso



Assinatura

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus e à Nossa Senhora por guiarem meu caminho e me darem forças para superar as dificuldades.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Aos meus orientadores prof<sup>o</sup>. Dr. Marcello Garcia Trevisan e prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jerusa Simone Garcia por terem feito parte deste desafio, pelo apoio, amizade, dedicação e conhecimentos construídos e confiança depositada na realização deste trabalho.

Ao Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, em especial, ao Laboratório de Sistemas de Liberação Tópico/Transdérmico, da prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gislaine Ribeiro Pereira que auxiliou nos testes de dissolução e nos cedeu suas instalações. Ao seu aluno de doutorado André Luís Morais Ruela pela ajuda em todas as etapas da análise de liberação.

Aos colegas e amigos de jornada, Ari, Josi, Alexandre, Rapha, Marcus, Lari, Fer Monteiro, Fer Olímpio, Amanda e Cleydson, do Laboratório de Análise e Caracterização de Fármacos e Medicamentos pelos ensinamentos, convívio e ajuda sempre que necessário.

Ao meu namorado, Rodolfo Santos Duarte, por toda atenção e companheirismo.

Por último, mas não menos importante, minha eterna gratidão à minha família (minha mãe Telma, meu pai Luis Carlos e minha irmã Naiara) que nunca deixaram de me apoiar, de incentivar e se alegrar com minhas conquistas.

Muito obrigada!

*“Aprenda como se fosse viver para sempre. Viva como se fosse morrer amanhã”.*

- Manhatma Gandhi

*“Quem deseja ver o arco-íris, precisa aprender a gostar da chuva”.*

- Paulo Coelho

## RESUMO

A intolerância à lactose é caracterizada pela falta da enzima lactase ( $\beta$ -galactosidase) e atinge quase 50% da população. O tratamento se baseia em uma dieta restritiva de produtos lácteos o que pode acarretar em prejuízo nutricional e estar associada com a diminuição da densidade mineral óssea e fraturas. Nosso objetivo foi avaliar uma formulação de lactase gastro-resistente para garantir uma maior atividade no local de ação da enzima (lúmen do intestino delgado). Concomitantemente, também avaliamos a estabilidade e a atividade enzimática do produto comercial americano (comprimidos de Lactaid® 9000 U). E por fim, desenvolvemos um método analítico para quantificar o teor de lactase em formulações sólidas através da espectroscopia na região do infravermelho. Ao realizar o teste de estabilidade nota-se que a embalagem primária é fundamental na manutenção da atividade enzimática da lactase. Ao término do estudo de estabilidade, os comprimidos que estavam dentro da sua embalagem primária tiveram uma diminuição da sua atividade de aproximadamente 7,5%, enquanto os comprimidos que foram armazenados fora da sua embalagem original tiveram uma perda de aproximadamente 35%. Ao realizar o teste de dissolução também do produto comercial americano nota-se que a formulação existente não é capaz de proteger a enzima da ação degradante do ambiente gástrico do estômago, apresentando ao final do teste uma perda de 65% de atividade enzimática. Em comparação com a forma farmacêutica gastro-resistente, não houve perda de atividade durante a etapa ácida e ao final do ensaio de dissolução a atividade encontrada foi de 93%. Quanto ao método de quantificação por infravermelho, constatou-se que a o melhor modelo de calibração multivariada (PLS) apresenta 7 VL, RMSECV de 4,3 %, RMSEP de 1,2% e os dados obtidos com o MIR é muito similar com os dados obtidos pelo método USP de referência.

**Palavras chave:**  $\beta$ -galactosidase. Formulação Gastro-resistente. Quimiometria. Espectroscopia na região do infravermelho. Controle de Qualidade.

## ABSTRACT

Lactose intolerance is characterized by the absence of the enzyme lactase ( $\beta$ -galactosidase) and affects almost 50% of the population. The treatment is based on a restrictive diet of dairy products which can result in nutritional loss and is associated with decreased bone mineral density and fractures. Our aim was to evaluate a lactase gastro formulation to ensure increased activity in the action site of the enzyme (lumen of the small intestine). Simultaneously, we also evaluated the stability and enzyme activity of the American commercial product (tablets of Lactaid® 9000 U). And lastly, we developed an analytical method for measuring the lactase content in solid formulations by spectroscopy in the infrared region. In carrying out the stability test to note that the primary packaging is critical in maintaining the enzymatic activity of lactase. At the end of the stability study, the tablets that were in the primary package had a decrease in their activity by approximately 7.5%, while the tablets were stored outside of its original container had a loss of approximately 35%. When carrying out dissolution test also the American commercial product it is noted that the existing formulation is not able to protect the enzyme from the degrading action of gastric environment of the stomach, with the end of the test a loss of 65% of enzyme activity. Compared with the gastroresistant pharmaceutical form there was no loss of activity during the acid step and the end of the dissolution test the activity was found 93%. As regards the measurement method by IR, it was found that the best multivariate calibration model (PLS) features 7 LV, RMSECV 4.3%, RMSEP of 1.2% and the data obtained with MIR is very similar to the data obtained by the USP reference method.

**Keywords:**  $\beta$ -galactosidase. Gastroresistant formulation. Chemometrics. Infrared spectroscopy. Quality control.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MIR	- Infravermelho médio (Medium infrared)
UV	- Ultravioleta
HPMC	- Hidróxipropilmetilcelulose
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Q	- Quantidade dissolvida do fármaco
EUA	- Estados Unidos da América
FDA	- Food and Drug Administration
U	- Unidades de enzima
UV-Vis	- Espectroscopia na região do ultravioleta-visível
ONPG	- Orto-nitrofenil-b-D-galactosídeo
ONP	- Orto-nitrofenol
ICH	- Conferência Internacional de Harmonização (International Conference on Harmonisation)
ATR-FTIR	- Espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier e acessório de reflectância total atenuada (attenuated total reflectance with Fourier transform infrared)
IV	- Espectroscopia na região do infravermelho (Infrared spectroscopy)
NIR	- Infravermelho próximo (Near Infrared)
PLS	- Mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares)
VL	- Variáveis latentes
R <sup>2</sup>	- Coeficiente de regressão

RMSE	- Erro quadrático médio (root mean square error)
RMSEC	- Erro quadrático médio de calibração (root mean square error of calibration)
RMSECV	- Erro quadrático médio de validação cruzada (root mean square error of cross validation)
RMSEP	- Erro quadrático médio de previsão (root mean square error of prediction)
API	- Ingrediente Farmacêutico Ativo (Active Pharmaceutical Ingredient)
SNV	- Variável normal padronizada (Standard Normal Variate)
MSC	- Correção multiplicativa de sinal (Multiplicative Signal Correction)
MC	- Média central (Mean Center)
CV	- Coeficiente de variação
Abs	- Absorbância
LQ	- Limite de Quantificação
LD	- Limite de Detecção
DPR	- Desvio padrão relativo

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Produto comercial americano Lactaid® Fast Act Caplets: contendo 9000 U.....	18
Figura 2 -	Cesta para agitação (aparato 1) do meio de dissolução.....	23
Figura 3 -	Pá para agitação (aparato 2) do meio de dissolução.....	24
Figura 4 -	Estrutura bidimensional da enzima $\beta$ -galactosidase proveniente do fungo filamentoso <i>Aspergillus oryzae</i> .....	26
Figura 5 -	O-nitrofenol-b-D-galactosídeo ONPG – Reação de hidrólise e estrutura da lactose.....	29
Figura 6 -	Vibrações de deformações angulares.....	31
Figura 7 -	Espectrofotômetro na região do infravermelho médio com transformada de Fourier com reflectância total atenuada ATR-FTIR..	32
Figura 8 -	Curva analítica utilizada para determinar a atividade enzimática das amostras que estão na estabilidade acelerada.....	48
Figura 9 -	Atividade enzimática dos comprimidos de Lactaid® Fast Act 9000 U ao longo do estudo de estabilidade.....	53
Figura 10 -	Curva analítica utilizada para determinar a atividade enzimática das amostras do teste de dissolução.....	55
Figura 11 -	Curva decrescente da atividade enzimática durante o estudo de dissolução dos comprimidos comerciais.....	56
Figura 12 -	Curva crescente da atividade enzimática das cápsulas gastro-resistentes durante o ensaio de dissolução.....	58
Figura 13 -	Gráfico da atividade enzimática do produto comercial e da formulação gastroresistente.....	59
Figura 14 -	Quantidade mínima de lactase na formulação com diferentes tempos de agitação: 1 minuto (a), 5 minutos (b), 10 minutos (c) e 15 minutos (d).....	60
Figura 15 -	Quantidade máxima de lactase na formulação com diferentes tempos de agitação: 1 minuto (a), 5 minutos (b), 10 minutos (c) e 15 minutos (d).....	61
Figura 16 -	Espectro de infravermelho de lactase pura.....	63

Figura 17 -	Espectros de infravermelho das 100 amostras de formulação de lactase utilizadas para preparar o modelo de calibração.....	64
Figura 18-	Espectros de infravermelho de todos os componentes presentes na amostra.....	65
Figura 19 -	Resíduos de Student versus <i>leverage</i> para as 100 amostras da calibração.....	66
Figura 20 -	Espectros de infravermelho das 66 amostras de formulação de lactase utilizadas para preparar o modelo de calibração.....	67
Figura 21 -	Gráfico de correlação entre os dados medidos x preditos.....	68
Figura 22 -	Gráfico da validação dos dados preditos.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Variação do pH e tempo de trânsito no trato gastro-intestinal.....	20
Tabela 2 -	Tipos de formas farmacêuticas sólidas orais de liberação modificada...	20
Tabela 3 -	Critérios de aceitação para o Estágio ácido do teste de dissolução realizado para formas farmacêuticas de liberação retardada.....	25
Tabela 4 -	Critérios de aceitação para o Estágio básico do teste de dissolução realizado para formas farmacêuticas de liberação retardada.....	25
Tabela 5 -	Determinação quantitativa por espectroscopia no infravermelho.....	38
Tabela 6 -	Proporções dos excipientes na formulação avaliada.....	44
Tabela 7 -	Dados da construção da curva analítica utilizada para determinar a atividade enzimática das amostras que estão na estabilidade acelerada...	47
Tabela 8 -	Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD).....	47
Tabela 9 -	Análise da absorvância das amostras no tempo zero da estabilidade acelerada.....	48
Tabela 10 -	Análise da atividade enzimática das amostras no tempo zero da estabilidade acelerada.....	49
Tabela 11 -	Análise da absorvância das amostras dentro da embalagem primária de 3 meses da estabilidade acelerada.....	49
Tabela 12 -	Análise da atividade enzimática das amostras dentro da embalagem primária de 3 meses de estabilidade acelerada.....	50
Tabela 13 -	Análise da absorvância das amostras fora da embalagem primária de 3 meses da estabilidade acelerada.....	50
Tabela 14 -	Análise da atividade enzimática das amostras fora da embalagem primária de 3 meses de estabilidade acelerada.....	51
Tabela 15 -	Análise da absorvância das amostras dentro da embalagem primária de 6 meses da estabilidade acelerada.....	51
Tabela 16 -	Análise da atividade enzimática das amostras dentro da embalagem primária de 6 meses de estabilidade acelerada.....	52
Tabela 17 -	Análise da absorvância das amostras fora da embalagem primária de 6 meses da estabilidade acelerada.....	52
Tabela 18 -	Análise da atividade enzimática das amostras fora da embalagem	52

	primária de 6 meses de estabilidade acelerada.....	
Tabela 19 -	Dados da construção da curva analítica utilizada para determinar a atividade enzimática das amostras do teste de dissolução.....	54
Tabela 20 -	Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD).....	54
Tabela 21 -	Análise da absorbância do estudo de dissolução das amostras dos comprimidos comerciais americanos.....	55
Tabela 22 -	Análise da atividade enzimática do estudo de dissolução das amostras dos comprimidos comerciais americanos.....	56
Tabela 23 -	Análise da absorbância do estudo de dissolução das amostras das cápsulas gastro-resistentes.....	57
Tabela 24 -	Análise da atividade enzimática do estudo de dissolução das amostras das cápsulas gastro-resistentes.....	57
Tabela 25 -	Atividade enzimática do produto comercial e da formulação gastro-resistente.....	58
Tabela 26 -	Média dos desvios padrões das quintuplicatas dos dados processados e não processados.....	62
Tabela 27 -	Resultados da calibração e da validação da formulação farmacêutica utilizando PLS.....	64
Tabela 28 -	Resultados obtidos da quantificação da $\beta$ -galactosidase utilizando PLS.....	66
Tabela 29 -	Resultados da validação da formulação farmacêutica utilizando modelo PLS.....	67
Tabela 30 -	Resultados obtidos das amostras controles por MIR e pelo método de referência.....	68
Tabela 31 -	Média dos desvios padrões das quintuplicatas do teste de homogeneidade de misturas.....	69

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1	INTOLERÂNCIA À LACTOSE.....	16
1.1.1	<b>Produtos comerciais disponíveis para tratamento da intolerância à lactose.....</b>	<b>17</b>
1.2	CÁPSULAS GASTRO-RESISTENTES.....	19
1.2.1	<b>Fisiologia do trato gastro-intestinal: pH e tempo de esvaziamento.....</b>	<b>19</b>
1.2.2	<b>Formas farmacêuticas de liberação modificada.....</b>	<b>20</b>
1.2.3	<b>Formas farmacêuticas de liberação entérica.....</b>	<b>21</b>
1.2.4	<b>Cápsulas revestidas com hipromelose.....</b>	<b>21</b>
1.2.4.1	Teste de dissolução para cápsulas de liberação entérica.....	22
1.3	$\beta$ -GALACTOSIDASE.....	26
1.4	ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS EM ESTUDOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	27
1.4.1	<b>Fundamentos da espectrofotometria UV-Vis.....</b>	<b>28</b>
1.4.2	<b>Determinação da atividade enzimática.....</b>	<b>28</b>
1.4.3	<b>Estudos de estabilidade acelerada e avaliação da atividade enzimática.....</b>	<b>29</b>
1.5	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS E BIOFÁRMACOS.....	30
1.5.1	<b>Fundamentos da espectroscopia no infravermelho.....</b>	<b>30</b>
1.5.2	<b>Quantificação de fármacos por IV.....</b>	<b>33</b>
1.5.3	<b>Teste de homogeneidade de misturas.....</b>	<b>33</b>
1.6	ANÁLISE MULTIVARIADA (QUIMIOMETRIA).....	34
1.6.1	<b>Métodos de pré-processamento.....</b>	<b>35</b>
1.6.2	<b>Regressão por quadrados mínimos parciais (PLS).....</b>	<b>36</b>
1.6.3	<b>Aplicação da quimiometria para quantificar fármacos em formulações farmacêuticas.....</b>	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>41</b>
3.1	REAGENTES.....	41
3.1.1	<b>Padrões, reagentes e solventes.....</b>	<b>41</b>

3.1.2	<b>Equipamentos e acessórios.....</b>	42
3.2	<b>MÉTODOS.....</b>	42
3.2.1	<b>Avaliação da estabilidade e da atividade enzimática do produto comercial.....</b>	43
3.2.1.1	Teste de atividade enzimática.....	43
3.2.2	<b>Avaliação de formulação gastro-resistente contendo <math>\beta</math>-galactosidase e análise do perfil de dissolução.....</b>	44
3.2.2.1	Teste de dissolução e análise da atividade enzimática.....	45
3.2.3	<b>Espectrofotometria IV e técnicas quimiométricas para quantificação da <math>\beta</math>-galactosidase em formulações farmacêuticas.....</b>	45
3.2.3.1	Espectroscopia IV e análise multivariada.....	46
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	47
4.1	ESTUDO DE ESTABILIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	47
4.2	ANÁLISE DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DAS FORMAS FARMACÊUTICAS.....	54
4.3	MÉTODO ANALÍTICO DE ANÁLISE MULTIVARIADA	59
4.3.1	Teste de homogeneidade de misturas.....	59
4.3.2	Análise quantitativa de $\beta$ -galactosidase.....	62
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	71
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	72

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 INTOLERÂNCIA À LACTOSE

A intolerância à lactose é caracterizada pela falta da enzima lactase ( $\beta$ -galactosidase) e atinge quase 50% da população (PEREIRA FILHO; FURLAN, 2004; MATTAR et al., 2009).

Um método eficaz de detectar os diferentes níveis de intolerância à lactose é o método de Kerpel-Fronius *et al.* denominado de Método de sobrecarga de lactose (KERPEL-FRONIUS et al., 1966). A prova de sobrecarga consiste em verificar a concentração de glicose no sangue dos pacientes em jejum de 8 a 10 horas e nas novas amostras de sangue colhidas de 15, 30 e 60 minutos após a administração oral de lactose pura na dose de 2g/Kg do paciente, sem exceder a dose máxima de 50g (KERPEL-FRONIUS et al., 1966).

Pereira Filho otimizou o método de sobrecarga de lactose e utilizou o método da Glicose-oxidase, em que o uso da enzima glicose-oxidase é utilizada para catalisar a oxidação da glicose em ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Assim, o peróxido de hidrogênio reage com a 4-animoantipirina e fenol formando um complexo que absorve em 505 nm e é diretamente proporcional à concentração de glicose (PEREIRA FILHO; FURLAN, 2004).

Os dados obtidos das coletas de sangue são classificados em três categorias de acordo com Kerpel-Fronius *et al.*:

- a) Não absorvedor (intolerante à lactose): quando o aumento da glicemia em qualquer período não ultrapassar 20 %;
- b) Limítrofe (mal absorvedor de lactose): quando o aumento variar entre 20 e 34 %;
- c) Bom absorvedor (normalidade): quando o aumento ultrapassar 34 %.

### 1.1.1 Produtos comerciais disponíveis para tratamento da intolerância à lactose

Nos EUA a produção de comprimidos de lactase já é uma realidade visto que a patente data do ano 2000 (KULKARNI et al., 2000). Porém esses comprimidos não são revestidos e assim que chegam ao estômago, o pH baixo começa a degradar a enzima e como consequência disto, uma baixa biodisponibilidade é encontrada no local de ação enzimática (lúmen do intestino delgado). Não foi encontrado nada na literatura sobre produtos que contenham alguma proteção enzimática, tais como: cápsulas gastro-resistentes ou comprimidos que utilizam revestimento entérico.

O produto contendo  $\beta$ -galactosidase é classificado como suplemento alimentício de acordo com a FDA, portanto ele é isento de passar por testes de qualidade, eficácia e estabilidade (BLENDON et al., 2001; ADMINISTRATION, 2008). Como os suplementos alimentícios não necessitam de testes de acordo com o FDA é possível que contenham algumas irregularidades quanto ao teor e à atividade enzimática.

O papel da FDA começa após o produto ter ido para o mercado; uma vez que um suplemento alimentar está no mercado, a agência tem responsabilidade no controle de segurança. Estes incluem o acompanhamento da notificação obrigatória de eventos adversos graves por parte das empresas de suplemento alimentar e voluntárias de relatórios de eventos adversos por parte dos consumidores, produtores e profissionais de saúde (BLENDON et al., 2001; ADMINISTRATION, 2008).

Os produtos comerciais americanos disponíveis para o tratamento da intolerância à lactose são vários, porém os mais utilizados são os produtos da marca Lactaid®.

Para os diferentes níveis de intolerância, existem no mercado três tipos de Lactaid® (LACTAID, 2015):

- a) Lactaid® Original Strength Caplets: contendo 3000 U;
- b) Lactaid® Fast Act Caplets: contendo 9000 U;
- c) Lactaid® Fast Act Chewables: contendo 9000 U.

A figura 1 abaixo é um exemplo do produto comercial americano Lactaid® Fast Act Caplets: contendo 9000 U utilizada nos ensaios de estabilidade.

Figura 1: Produto comercial americano Lactaid® Fast Act Caplets: contendo 9000 U.



Fonte: (LACTAID, 2015).

A unidade utilizada para determinar a concentração da enzima ou sua atividade enzimática é a *enzyme unit* (U), onde U é definido como a quantidade de enzima que produz certa quantidade de atividade enzimática, isto é, e a quantidade que catalisa a conversão de 1 $\mu$ mol de substrato por minuto (BIOCHEMISTRY, 1979).

A importância desta enzima como suplemento é auxiliar no tratamento de pacientes com intolerância à lactose com o objetivo de diminuir os sintomas como inchaço, cólicas, flatulências e diarreias após o consumo de alimentos lácteos (TOMAR, 2014; DIEKMANN et al., 2015).

As alternativas existentes no mercado brasileiro para o tratamento da intolerância à lactose baseiam-se em uma restrição de produtos lácteos da dieta ou na administração da lactase em sachês onde a enzima é adicionada à comida ou bebida uma a duas horas antes da ingestão do alimento ou bebida láctea.

Mas uma dieta restritiva de produtos lácteos pode acarretar prejuízo nutricional de cálcio, fósforo e vitaminas, podendo estar associada com a diminuição da densidade mineral óssea e fraturas (MATTHEWS et al., 2005); e o uso da lactase em sachês acaba se tornando um inconveniente quando o paciente não está em sua casa devido à dificuldade de adicionar o conteúdo do sachê durante a preparação da refeição ou da bebida.

Um novo informe técnico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) esclarece que o enquadramento do uso de enzimas e preparações enzimáticas na área de alimentos é permitido com propósito funcional, desde que atenda

os requisitos de segurança, qualidade e eficácia estabelecida na legislação vigente (ANVISA, 1999; 2015). Esses requerimentos são essenciais para garantir que os produtos disponíveis no mercado sejam seguros para consumo e tenham um nível adequado de qualidade e eficácia.

## 1.2 CÁPSULAS GASTRO-RESISTENTES

Cápsulas gastro-resistentes ao trato gastro-intestinal são frequentemente usadas com diversos propósitos. Entre eles estão a proteção de fármacos/biofármacos instáveis em meio ácido como é o caso da  $\beta$ -galactosidase; quando o fármaco produz náuseas ou vômitos ao ser liberado no estômago; quando for importante que a substância ativa não seja liberada antes de atingir o intestino e só deve produzir o seu efeito máximo no duodeno ou no jejuno(a  $\beta$ -galactosidase também se encaixa neste quesito); quando se deseja fazer com que a substância ativa esteja disponível após um período de tempo (DE OLIVEIRA FERREIRA; BRANDÃO, 2008).

### 1.2.1 Fisiologia do trato gastro-intestinal: pH e tempo de esvaziamento

O pH fisiológico e o tempo de esvaziamento do trato gastrintestinal variam ao longo de sua extensão, sofrendo influência da alimentação. A compreensão da fisiologia do sistema digestivo é fundamental para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação modificada (AIACHE et al., 1979). A tabela 1 relaciona a variação fisiológica do pH e o tempo de trânsito no trato gastrintestinal:

Tabela 1: Variação do pH e tempo de trânsito no trato gastro-intestinal.

<b>Região do trato gastro-intestinal</b>	<b>pH médio</b>	<b>Tempo de permanência</b>
Boca e esôfago	6,7 a 7,0	2 a 10 segundos conforme consistência
Estômago	1,0 a 2,0 em jejum; 3,0 dependendo da refeição	Pequenos volumes de líquido em jejum: 10 minutos a 1 hora; Refeições: 1 a 8 horas;
Duodeno	4,0 a 6,0	5 a 15 minutos
Jejuno	6,0 a 7,0	2 a 3 horas e 30 minutos
Íleo	7,0 a 8,0	3 a 6 horas
Cólon	7,0 a 8,0	Ceco e cólon ascendente: 1 hora; Cólon transversal: 3 a 4 horas; Cólon descendente: 3 horas

Fonte: (AIACHE, J., 1979)

### 1.2.2 Formas farmacêuticas de liberação modificada

Uma forma farmacêutica de liberação modificada compreende um sistema onde a liberação do fármaco é determinada de acordo com objetivos ou conveniências não oferecidas pelos sistemas de pronta liberação. Abrange todos os sistemas diferentes dos convencionais de acordo com a United States Pharmacopeia – USP (USP, 2005). As formas farmacêuticas sólidas orais de liberação modificada compreendem, dentre outros, os seguintes tipos relacionados na Tabela 2:

Tabela 2: Tipos de formas farmacêuticas sólidas orais de liberação modificada.

<b>Tipos de liberação</b>	<b>Definição</b>
Controlada (liberação prolongada, ação prolongada, liberação lenta, liberação sustentada)	A liberação do fármaco ocorre lentamente e em quantidade constante por unidade de tempo, quando comparado com sistema convencional.
Retardada	A liberação do fármaco ocorre em período de tempo bem definido após Administração do medicamento.
Ação repetida	Há liberação sequencial de 2 doses completas do fármaco. Inicialmente é liberada uma dose equivalente à convencional, contida na parte externa. Posteriormente é libertada a dose incorporada no núcleo. Esta manterá o nível plasmático efetivo idêntico à tomada de doses consecutivas de um medicamento convencional.

Fonte: adaptado USP, 2005.

### 1.2.3 Formas farmacêuticas de liberação entérica

Formas farmacêuticas com revestimento entérico são consideradas de liberação modificadas desenvolvidas para liberar seu conteúdo ativo no intestino. São geralmente formas farmacêuticas sólidas, compreendendo grânulos, cápsulas ou comprimidos de liberação modificada que resistem sem alteração, à ação do suco gástrico e que, em contrapartida, devem desagregar rapidamente no suco intestinal. As formas de liberação entérica são também designadas como formas de *liberação retardada*, ou seja, aquelas que liberam o fármaco em tempo diferente do sistema convencional e em local bem determinado, sendo depois, a liberação praticamente imediata (LOPES et al., 2005; USP, 2005).

O revestimento entérico é também empregado com os seguintes objetivos: evitar a degradação de fármacos sensíveis ao pH ácido do estômago; reduzir os efeitos adversos de alguns fármacos; retardar a liberação do fármaco; mascarar sabores e odores desagradáveis; garantir que o fármaco só produza o seu efeito máximo no duodeno ou jejuno; permitir que o fármaco seja liberado em partes distantes do aparelho digestivo, como no cólon e / ou evitar que o fármaco sofra diluições antes de atingir o seu sítio de ação ideal em determinada região (PRISTA et al., 2011).

Os revestimentos entéricos mais utilizados são aqueles que permanecem não dissociados no pH baixo do estômago, mas que rapidamente se ionizam quando o pH se eleva para quatro ou cinco (REMINGTON et al., 2006).

### 1.2.4 Cápsulas revestidas com hipromelose

Hipromelose ou HPMC (hidróxiopropilmetilcelulose) é largamente utilizada em formulações orais, oftálmicas, nasais e tópicas. Nas formulações orais, a hipromelose é usada como aglutinante em comprimidos, em filmes de revestimento e em matrizes para formulações de liberação extendidas. Além disso, ela também é utilizada na confecção de cápsulas (ROWE et al., 2009).

Quando a própria cápsula é feita de derivados de celulose é esperado que a cápsula atuasse como uma forma farmacêutica de liberação entérica (HUYGHEBAERT et al., 2004).

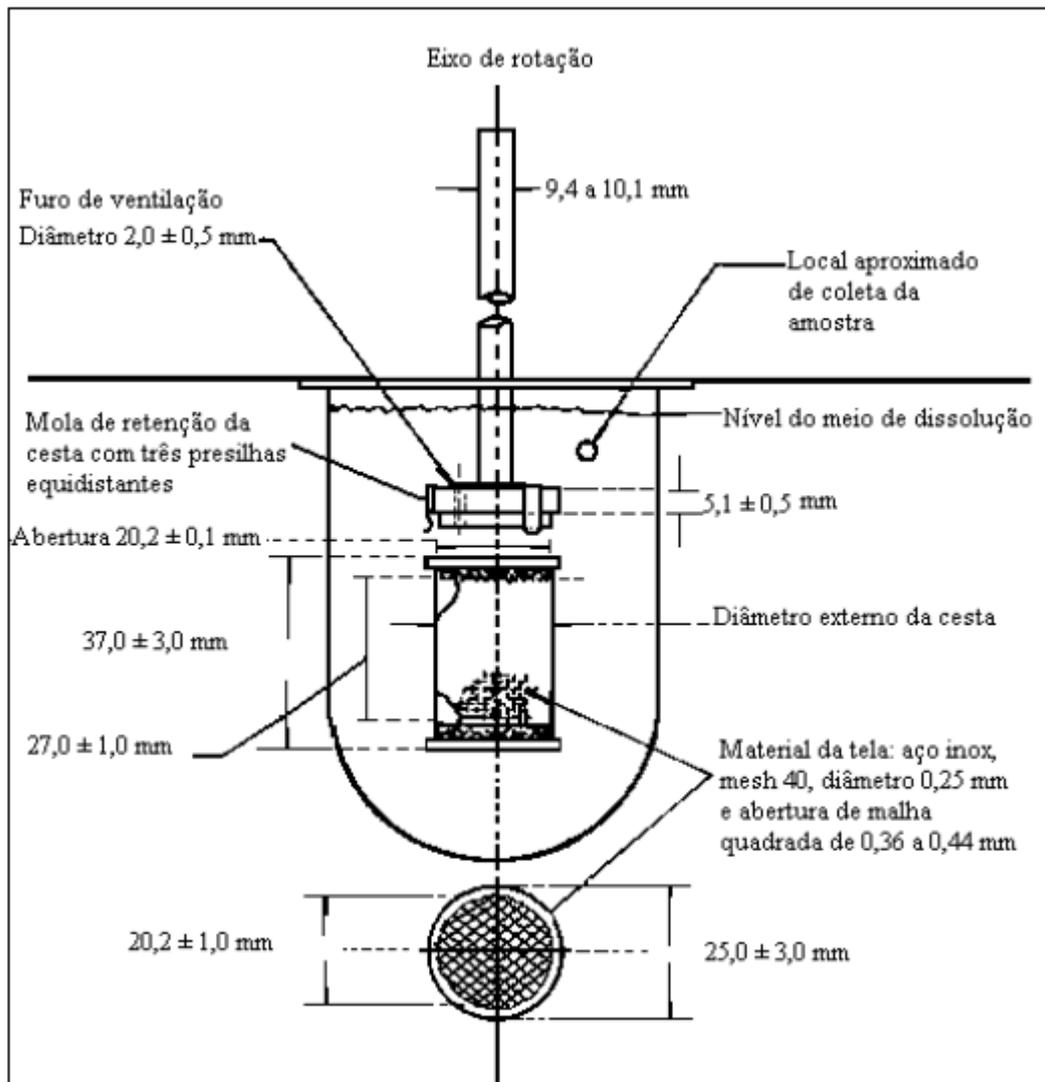
Recentemente, cápsulas vegetais com base em hipromelose são comercializadas. Estas cápsulas mantêm a sua estabilidade mecânica em mudanças de temperatura e baixa umidade.

Marzorati *et.al.* 2015, mostraram que as cápsulas de hipromelose fornecem uma capacidade superior de proteger tanto a viabilidade de probióticos quanto a estabilidade de enzimas sob condições de pH baixo idêntico ao encontrado no estômago, diferente da situação encontrada com as cápsulas de gelatina tradicionais. As cápsulas de HPMC não mostraram desintegração no ambiente ácido e abriram somente nas condições simuladas de pH da porção menor do intestino delgado (MARZORATI et al., 2015).

#### 1.2.4.1 Teste de dissolução para cápsulas de liberação entérica

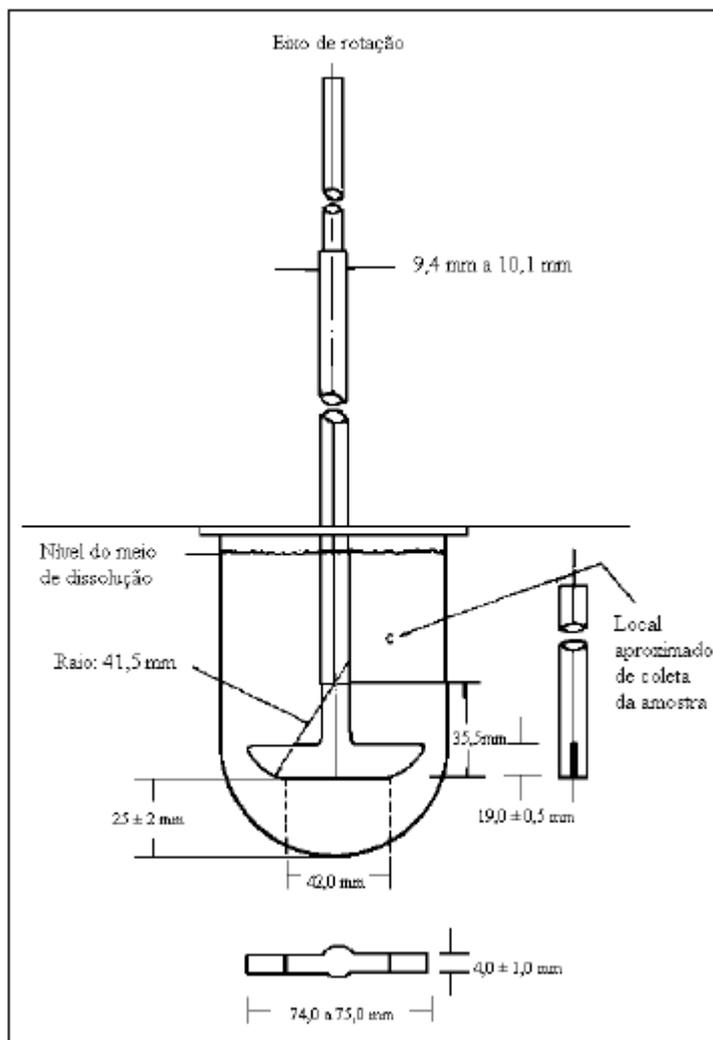
O teste de dissolução determina a porcentagem de princípio ativo, liberado no meio de dissolução, dentro do período de tempo especificado na monografia de cada produto, quando o mesmo é submetido à ação de aparelhagem específica, denominado dissolutor (Figuras 2 e 3), sob condições experimentais descritas na farmacopéia brasileira disponibilizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (FARMACOPÉIA, 2010).

Figura 2: Cesta para agitação (aparato 1) do meio de dissolução.



Fonte: (FARMACOPÉIA, 2010)

Figura 3: Pá para agitação (apareto 2) do meio de dissolução.



Fonte: (FARMACOPÉIA, 2010).

A cesta, aparato 1, apresenta a vantagem de confinar a forma farmacêutica a uma área limitada, mantendo-a imersa no meio para conseguir uma melhor reprodutibilidade do método. Isto torna a cesta vantajosa para o ensaio com cápsulas que tendem a flutuar e podem perder a superfície de contato com o meio de dissolução (ABDOU, 1989).

Em cada ensaio, coloca-se nas cubas o volume de meio de dissolução, de acordo com a monografia correspondente ao produto. As cubas são submersas em banho de água e mantidas em temperatura homogênea de  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  (FARMACOPÉIA, 2010). A seguir o produto a ser testado é imerso na cuba ou colocado na cesta, acionando-se o agitador na velocidade especificada na monografia farmacopéica correspondente. Em intervalos determinados, são retiradas amostras para determinação da quantidade de fármaco dissolvido (ANSEL et al., 2000).

O método geral para formas farmacêuticas de liberação entérica consiste em testar o produto em HCl 0,1 N por 2 horas e, então, o meio ácido é drenado e substituído pelo tampão pH 6,8 preparado com a mistura de fosfato de sódio tribásico 0,1M e HCl 0,1N. A temperatura do meio repostado precisa ser pré-equilibrada a 37°C. O objetivo do teste é verificar se não houve dissolução significativa na etapa ácida, que deverá ser menor que 10% para qualquer amostra (FARMACOPÉIA, 2010).

Os critérios de aceitação geral para formas de liberação entérica nas etapas ácida e básica estão relacionados nas Tabelas 3 e 4:

Tabela 3: Critérios de aceitação para o Estágio ácido do teste de dissolução realizado para formas farmacêuticas de liberação retardada.

Estágios	Nº de unidades testadas	Critérios de aceitação
A1	6	Nenhuma unidade individual apresenta quantidade dissolvida superior a 10% do declarado.
A2	6	A média de 12 unidades não é superior a 10% do declarado e nenhuma unidade individual apresenta quantidade dissolvida superior a 25% do declarado.
A3	12	A média de 24 unidades não é superior a 10% do declarado e nenhuma unidade individual apresenta quantidade dissolvida superior a 25% do declarado.

Fonte: (FARMACOPÉIA, 2010).

Tabela 4: Critérios de aceitação para o Estágio básico do teste de dissolução realizado para formas farmacêuticas de liberação retardada.

Estágios	Nº de unidades testadas	Critérios de aceitação
B1	6	Cada unidade apresenta resultado maior ou igual a $Q^* + 5\%$ .
B2	6	A média de 12 unidades é igual ou maior que $Q$ e nenhuma unidade apresenta resultado inferior a $Q - 15\%$ .
B3	12	A média de 24 unidades é igual ou maior que $Q$ , não mais do que 2 unidades apresentam resultados inferiores a $Q - 15\%$ e nenhuma unidade apresenta resultado inferior a $Q - 25\%$ .

Fonte: (ANVISA, 2010).

Nota: (\*) O termo  $Q$  corresponde à quantidade dissolvida do fármaco.

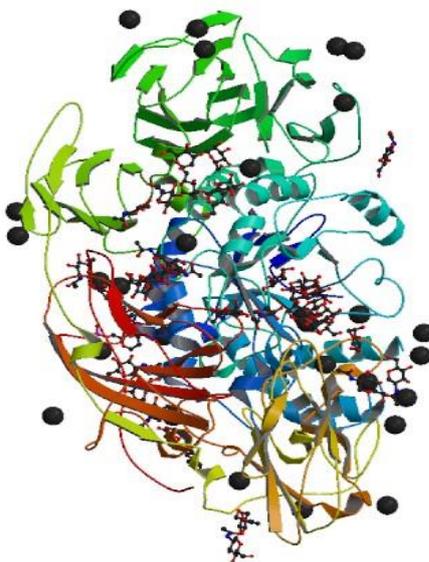
### 1.3 B-GALACTOSIDASE

A  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -D-galactosídeo galactohidrolase ou lactase é uma enzima responsável pela catálise da hidrólise de polissacarídeos, dentre eles, da lactose. Esta enzima é encontrada em diversos sistemas: como plantas, microorganismos e seres-humanos. Leveduras, bolores e as bactérias são a única fonte desta enzima para fins comerciais (USTOK et al., 2010).

Um exemplo de microrganismo utilizado na produção desta enzima é o *Aspergillus oryzae*, um fungo filamentoso. A lactase extraída é tetramérica, com 105 kDa, estável em pH que varia de 4,0 a 9,0; sendo que o pH ideal de atividade enzimática em relação a estrutura apresentada abaixo é levemente ácido (pH 4,5) e sua temperatura é de 50 °C (ANSARI; HUSAIN, 2012).

A estrutura bidimensional da enzima  $\beta$ -galactosidase está representada na Figura 4 a seguir.

Figura 4: Estrutura bidimensional da enzima  $\beta$ -galactosidase proveniente do fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*.



Fonte: (MAKSIMAINEN et al., 2013).

O uso clínico de tais biofármacos apresenta limitações, uma vez que a enzima em questão possui baixa estabilidade e tempo de comercialização reduzido, além do alto

custo. Sua exposição a condições extremas, como pH muito baixos ou altos e alta temperatura pode levar à inativação enzimática devido a formação de partículas insolúveis e agregados, além de desdobramento e degradação (NICHELE et al., 2011; OHTAKE et al., 2011).

Um estudo utilizando cromatografia por exclusão de tamanho com detecção UV mostrou que em pH 3,0 houve quase uma completa diminuição do pico da  $\beta$ -galactosidase; as alterações causadas pelo ambiente ácido são dependentes do tempo de exposição. A amostra submetida durante 1 hora à exposição ácida mostrou uma redução de 61% da intensidade do pico e depois de 2 horas o pico estava totalmente ausente (MONTEIRO, 2015).

Outro teste que comprova a instabilidade desta enzima foi feito utilizando eletroforese 2D-PAGE onde foi possível afirmar ainda que não só a degradação enzimática devido ao pH baixo resultou na baixa atividade da enzima como também sua estabilidade térmica foi comprometida, resultando na alteração da estrutura tridimensional da proteína (MONTEIRO, 2015).

Assim, esses fatores influenciam de maneira negativa na eficácia e segurança do produto biológico.

#### 1.4 ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS EM ESTUDOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Diversos métodos de medir a atividade catalítica das enzimas foram desenvolvidos e, apesar de novos métodos analíticos serem publicados, muitos métodos tradicionais são eficazes e ainda estão em uso. Entre eles, o método mais simples e acessível, utiliza reações colorimétricas, que são detectadas e quantificadas por espectrofotometria na região do ultravioleta/visível (UV-Vis). A principal vantagem da espectrofotometria, é que a quantificação apresenta baixo custo de operação e fácil manuseio.

### **1.4.1 Fundamentos da espectrofotometria UV-Vis**

A incidência de uma radiação contínua (feixe de luz) sobre uma amostra resulta em absorção da radiação, onde átomos e moléculas passam de um estado de energia mais baixa (estado fundamental) para um estado de energia maior (estado excitado). A radiação absorvida é quantizada, ou seja, tem um valor igual à diferença de energia entre os estados excitado e fundamental (PAVIA et al., 2010).

A absorção de energia depende da estrutura eletrônica da molécula, e por isso, a espectroscopia de absorção na região do UV-Vis tem ampla aplicação na caracterização de diversas espécies orgânicas e inorgânicas. Como a energia absorvida é quantizada, o espectro de uma única transição eletrônica deveria corresponder a uma linha discreta. Esta previsão não se confirma, uma vez que a absorção eletrônica se sobrepõe a subníveis rotacionais e vibracionais; assim, um espectro de UV-Vis tem o aspecto de uma banda (SKOOG ;WEST, 2009; PAVIA et al., 2010).

As principais características de uma banda de absorção correspondem ao valor de comprimento de onda em que ocorre a máxima absorção de energia e sua intensidade. Este comprimento de onda corresponde ao comprimento de onda da radiação cuja energia é igual à necessária para que ocorra a transição eletrônica. E a intensidade depende, principalmente, da interação entre a energia incidente e o sistema eletrônico (SKOOG ;WEST, 2009).

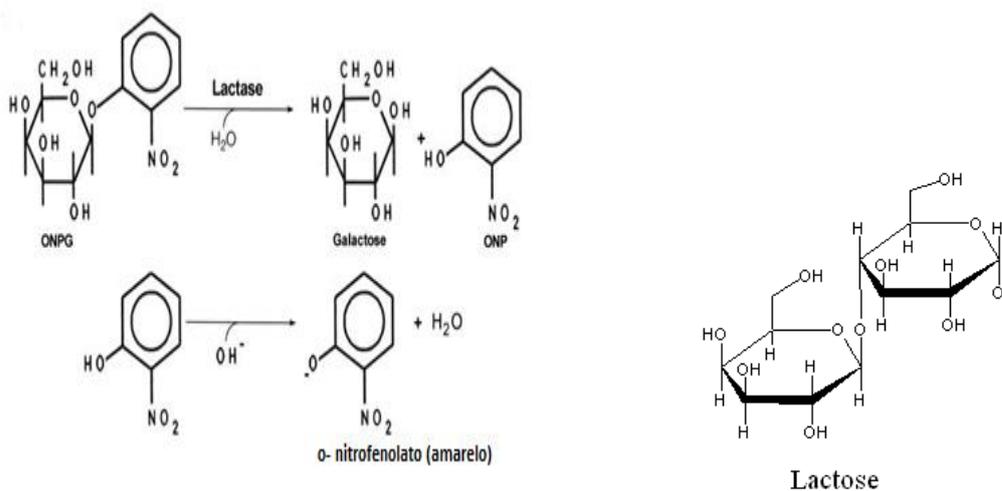
Uma expressão mais conveniente para a intensidade da luz é obtida através da lei de Lambert-Beer, que diz que a fração de luz absorvida por cada camada da amostra é a mesma. Ou seja, estabelece que a absorbância é diretamente proporcional ao caminho que a luz percorre na amostra, à concentração e a absorvidade (SKOOG ;WEST, 2009).

### **1.4.2 Determinação da atividade enzimática**

O método analítico oficial para a determinação da dosagem de lactase é descrito na farmacopéia americana onde o princípio da técnica é baseado em reação colorimétrica onde o substrato reage com a enzima gerando um produto com coloração

(USP, 2005). Um passo importante na determinação da atividade proteolítica é a escolha do substrato (BENDICHO et al., 2002). O substrato utilizado neste experimento foi o-nitrofenol-b-D-galactosídeo (ONPG) pois sua estrutura é semelhante à estrutura da lactose (Figura 5) e o processo de reação enzimática ocorrerá de forma semelhante. Quando hidrolisado, o ONPG forma galactose e o-nitrofenol (ONP), composto de coloração amarela. O composto ONP absorve a luz em 420 nm, enquanto que a molécula precursora de ONPG não. Portanto, o aumento da absorção de luz a 420 nm pode ser usado para monitorar a atividade da  $\beta$ -galactosidase quando o ONPG é utilizado como substrato (BIOTECK, 2001). Alterações do valor da absorbância da amostra quando comparada ao padrão, detectadas pelo espectrofotômetro, indicam variação da atividade enzimática.

Figura 5: O-nitrofenol-b-D-galactosídeo ONPG – Reação de hidrólise e a estrutura da lactose.



Fonte: (MILLER, 1992).

### 1.4.3 Estudos de estabilidade acelerada e avaliação da atividade enzimática

Como o produto contendo a enzima  $\beta$ -galactosidase é um suplemento alimentar e não um produto biológico/biotecnológico de acordo com a classificação vigente, ele não necessita de avaliação baseado na “Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano”

(Internacional Conference on Harmonisation - ICH) que elaborou guias com orientações sobre a qualidade de produtos biológicos/biotecnológicos.

O guia Q5C do ICH trata especificamente sobre testes de estabilidade desses produtos e o guia Q1A refere-se aos testes de estabilidade de novas drogas e produtos (GUIDELINE, 1995; GUIDELINE, 2003).

O cumprimento dessas orientações é imprescindível para a obtenção de produtos de alta qualidade, segurança e eficácia, além de dar credibilidade ao produto no âmbito internacional.

## 1.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS E BIOFÁRMACOS

A espectroscopia IV é uma técnica rápida e não destrutiva que provê uma determinação simultânea em qualquer amostra, além da amostra poder ser analisada sem nenhum tipo de preparo ou com preparo mínimo, evitando etapas que podem produzir erros. Outra vantagem é a previsão de parâmetros químicos, físicos ou mesmo a composição de algumas formulações. Vários parâmetros farmacêuticos de comprimidos como dureza, tamanho de partícula, força de compactação, taxa de dissolução ou o teor de água podem ser quantitativamente analisada por espectroscopia na região do infravermelho médio a partir de um único espectro, e o baixo custo da análise (JAMRÓGIEWICZ, 2012).

### 1.5.1 Fundamentos da espectroscopia no infravermelho

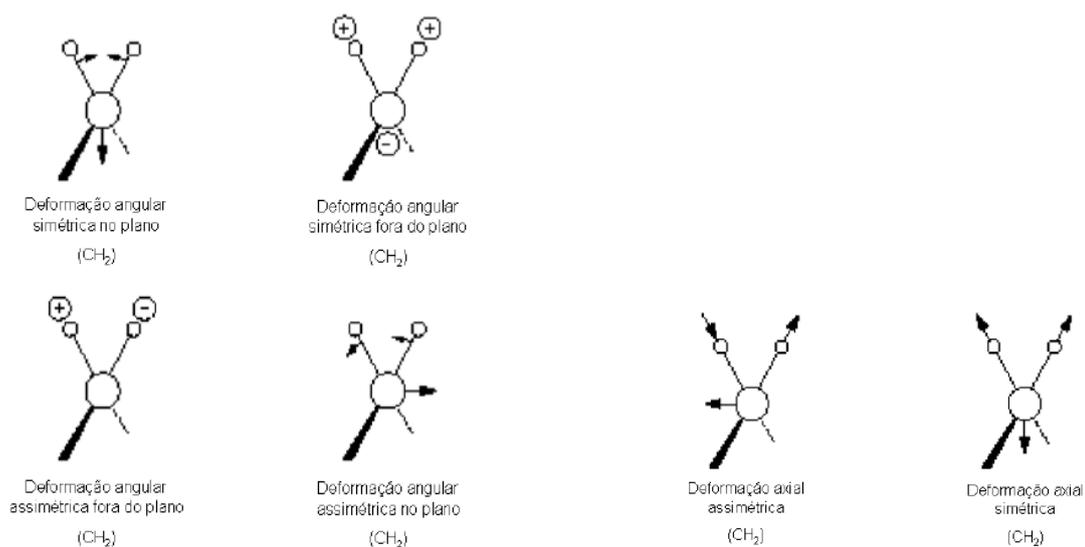
A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre a região do visível e as micro-ondas e é dividida em três regiões: infravermelho próximo de 12820 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , infravermelho médio de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  e infravermelho distante de 400 a 33  $\text{cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN, 2007).

A radiação infravermelha na faixa de aproximadamente  $10000$  a  $100\text{ cm}^{-1}$  converte-se em energia vibracional molecular quando absorvida e o processo é quantizado (SILVERSTEIN, 2007).

A vibração dos átomos no interior de uma molécula apresenta energia coerente com a região do espectro eletromagnético correspondente à radiação infravermelha. Para absorver radiação infravermelha, a molécula precisa sofrer alteração do momento dipolo decorrente dos movimentos vibracionais e rotacionais (REICH, 2005).

Os átomos de uma molécula nunca estão imóveis. Existem dois tipos de vibrações moleculares: as deformações angulares e as deformações axiais (Figura 6). A vibração de deformação angular corresponde a variações de ângulo de ligação, pode ser internamente em um conjunto de átomos ou de um grupo de átomos em relação à molécula como um todo. A vibração de deformação axial é um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação, de forma que a distância interatômica aumente e diminua alternativamente. As vibrações fundamentais não alteram a posição do centro de gravidade da molécula. A vibração dos átomos no interior de uma molécula apresenta energia coerente com a região do espectro eletromagnético correspondente a radiação infravermelha.

Figura 6: Vibrações de deformações angulares e axiais.



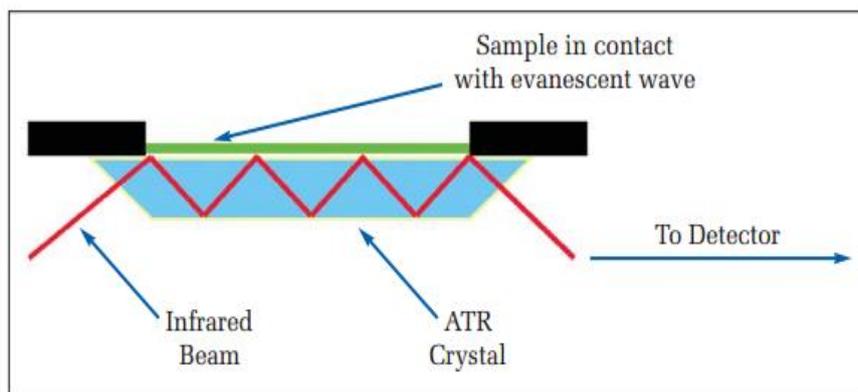
Fonte: (SILVERSTEIN, 2007).

Os elétrons sofrem influências de átomos e grupos vizinhos, influenciando no estiramento, comprimento e ângulo de ligação, e, portanto na frequência de vibração das ligações químicas, essas diferenças específicas de cada molécula é que proporcionam que cada uma delas tenha um espectro característico (BURNS, 2001).

A utilização da transformada de Fourier nos permite melhorar a análise das amostras através de transformações matemáticas que especifica que um sinal precisa ser amostrado pelo menos duas vezes em cada ciclo de variação, ou seja, a frequência de amostragem precisa ser no mínimo o dobro da maior frequência presente no sinal (SMITH, 2011).

A reflectância total atenuada opera medindo as mudanças que ocorrem em um feixe interno de infravermelho totalmente refletido quando o raio entra em contato com uma amostra. Em regiões do espectro de infravermelho onde a amostra absorve energia, o sinal é atenuado. O sinal atenuado volta para o feixe de infravermelho e, em seguida, sai pela extremidade oposta do cristal e é transmitido para o detector do espectrofotômetro (Figura 7) (ELMER, 2015).

Figura 7: Espectrofotômetro na região do infravermelho médio com transformada de Fourier com reflectância total atenuada ATR-FTIR.



Fonte: (Elmer, 2015)

Na última década, a espectroscopia IV tem tido grande aceitação na indústria farmacêutica para avaliação de matéria-prima, controle de qualidade do produto final, caracterização de polimorfos, monitoramento de processos e detectando possíveis transformações no produto nas etapas de embalagem e estocagem (REICH, 2005; LUYPAERT et al., 2007)

### 1.5.2 Quantificação de fármacos por IV

Quando se utilizam técnicas instrumentais de análise, a concentração é determinada indiretamente por meio de valores de determinadas propriedades físico-químicas do sistema, essa prática é conhecida como calibração. A calibração pode ser definida como uma série de operações matemáticas que estabelecem, sob determinadas condições, uma relação entre as medidas instrumentais e valores da propriedade de interesse (concentração de determinada espécie) (PIANTAVINI et al., 2014).

Em um estudo recente para investigar o potencial do uso da técnica de ATR-FTIR para a análise quantitativa de polimorfos de mesilato de imatinibe, os espectros do fármaco foram avaliados. O espectro da forma  $\alpha$  exibe uma banda vibratória em  $1446\text{ cm}^{-1}$  que o distingue da forma  $\beta$ . Quantidades em peso da forma  $\alpha$  foram adicionadas até atingir 100% da forma  $\alpha$ . Os espectros de ATR-FTIR demonstraram que a intensidade da banda a  $1446\text{ cm}^{-1}$  aumentou com o aumento da porcentagem em peso da forma  $\alpha$ . Assim, foi possível construir uma curva de calibração onde seu coeficiente de regressão foi de 0,977 sendo possível a quantificação dos polimorfos existente na formulação. (ATICI; KARLIĞA, 2015).

Em outro estudo envolvendo também a quantificação de polimorfos de irbesartana foi comprovado que o método utilizando espectrofotometria no infravermelho foi capaz de quantificar quantidades muito baixas do polimorfo B, o limite de detecção foi de 1,3% (m/m) (PAN et al., 2014).

Uma das vantagens da técnica de MIR é ser rápida e essa vantagem é aplicada quando o fármaco analisado é citotóxico, como é o caso do 5-fluoroacil e gemcitabina, em matriz aquosa por uma medição direta através do frasco de vidro em menos de 1 minuto; assim, a medição é não invasiva perfeito para limitar a exposição do operador aos fármacos anti-neoplásicos (LÊ et al., 2014).

### 1.5.3 Teste de homogeneidade de misturas

Um método de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) foi desenvolvido para controlar fluxo de pós durante o seu esvaziamento do misturador e detectar a

segregação da mistura de pós. O método é capaz de fornecer informações físicas (diferenças de tamanho de partícula) sobre os pós (BARAJAS et al., 2007).

Diferenças de tamanho de partículas são amplamente reconhecidos como responsáveis pela segregação, ou seja, as partículas dos pós dos diferentes excipientes utilizados para a produção de uma formulação podem se separar em diferentes fases, o que diminui a uniformidade do conteúdo devido à baixa homogeneidade da mistura. Os pós podem segregar na mistura à medida que são anuladas as tubulações para máquinas de compressão, aumentando a variabilidade do teor de fármaco e de dissolução dos comprimidos do produto final devido à segregação (BARAJAS et al., 2007).

Martínez *et al.* 2013 testaram a influência da agitação sob diferentes taxas de fluxo e agitação. O fluxo e a taxa de variação da agitação causaram diferentes dinâmicas de fluxo de pó, que se refletiram nas medições do IV.

As variações nas dinâmicas do escoamento do pó são detectadas no IV e devem ser inseridas na análise de dados para aumentar a robustez (MARTÍNEZ et al., 2013).

As taxas mais baixas de agitação reduziram as flutuações na saída do misturador e esse resultado pode ser relacionado com a melhor mistura e uma apresentação mais estável do pó para o IV (MARTÍNEZ et al., 2013).

A mistura dos excipientes juntamente com o princípio ativo é um processo crítico que pode determinar a homogeneidade do sistema ou a falta de homogeneidade onde o pó começa a segregar para além do tempo quando a homogeneidade é atingida. Esse fenômeno é atribuído ao tamanho de partícula e à alteração da distribuição da partícula decorrente do atrito devido à continuação da mistura (EL-HAGRASY et al., 2001).

Para cada formulação, um novo estudo de qual é o tempo ideal de mistura dos componentes deve ser realizado a fim de garantir um produto final de qualidade e que atenda às especificações dos órgãos reguladores.

## 1.6 ANÁLISE MULTIVARIADA (QUIMIOMETRIA)

Com o avanço da instrumentação e da tecnologia, uma grande quantidade de dados começou a ser gerado. Com a possibilidade de adquirir um número grande de dados de forma rápida e com o mínimo esforço, surge o obstáculo de como analisar

todos os dados adquiridos e extrair o máximo de informações, para isso foram utilizados métodos matemáticos e estatísticos (SENA et al., 2005). E assim foi criada uma nova área, chamada quimiometria.

A quimiometria pode ser definida como a aplicação de métodos matemáticos e estatísticos para análise de dados químicos de forma a extrair uma maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos (OTTO, 1999; FERREIRA et al., 2013).

Entre os métodos de calibração existentes, com certeza, os mais conhecidos são os métodos univariados, também chamados de calibração de ordem zero. Neste caso, tem-se apenas uma medida instrumental por amostra, ou seja. Os modelos univariados são de fácil aplicação e validação, porém é de restrita aplicação, pois é uma metodologia não livre de interferentes que possam provocar desvios entre resposta analítica e a concentração (FERREIRA et al., 1999; SENA et al., 2005).

Nos métodos de calibração multivariada, duas ou mais medidas instrumentais estão relacionadas com a propriedade de interesse. Em situações onde a determinação de um analito é dificultada ou impedida devido à presença de interferentes, o uso de calibração multivariada permite a modelagem desses interferentes junto com o analito de interesse. Nos últimos anos, as principais aplicações desta técnica estiveram no controle de qualidade de produtos farmacêuticos e a determinação de fármacos em amostras complexas (FERREIRA et al., 1999; SENA et al., 2005; SILVA et al., 2012).

### **1.6.1 Métodos de pré-processamento**

Antes de construir os modelos de regressão, faz-se necessário a utilização de métodos de pré-processamentos. Os métodos de pré-processamento têm com objetivo linearizar as repostas das variáveis e remover fontes de variância que não são de interesse na análise. A linearização dos conjuntos de dados é importante, pois os modelos, em geral, requerem que os dados sejam lineares (WISE et al., 2006).

Ao realizar uma calibração, quanto maior a relação sinal-ruído melhor, pois permite adquirir as menores características dos dados, assim o métodos de pré-processamento também tem o objetivo de intensificar os sinais de interesse e minizar os ruídos (HANSEN, 2001).

As derivadas são comumente utilizadas para remover sinais e alterações da linha base sem importância química e acentua as características de maior frequência. As variações restantes são devido às diferenças químicas entre as amostras. Um importante aspecto das derivadas é que não afeta as relações lineares entre os dados, isso porque as derivadas são operadores lineares (WISE et al., 2006).

E para dimensionar os dados uma ferramenta mais comumente utilizada é o auto escalonamento que fará com que cada coluna tenha o mesmo “tamanho” de modo que todas as variáveis tenham a mesma oportunidade de serem modelados (BRO ;SMILDE, 2014).

### **1.6.2 Regressão por quadrados mínimos parciais (PLS)**

O método de regressão PLS (Quadrados Mínimos Parciais, do inglês, *Partial Least Squares*) é o método mais robusto e utilizado em regressões de dados multivariados. Os modelos PLS não requerem o conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras, porém estas informações podem ajudar na construção e interpretação do modelo. Os dados para a construção do modelo PLS são organizados em dois blocos: a matriz X, com os vetores de respostas instrumentais, e a matriz Y, com os vetores referentes às propriedades de interesse. As matrizes X e Y são decompostas simultaneamente em uma soma de variáveis latentes (VL) (DE CARVALHO ROCHA et al., 2011).

A correlação entre os dois blocos X e Y é uma relação linear obtida pelo coeficiente de regressão linear. A melhor relação linear possível entre os escores desses dois blocos é obtida através de pequenas rotações das variáveis latentes dos blocos X e Y (DE CARVALHO ROCHA et al., 2011).

Nesse processo, é necessário achar o melhor número de variáveis latentes, o que normalmente é feito usando um procedimento chamado validação cruzada (*Cross Validation*), no qual o erro mínimo de previsão é determinado (SENA et al., 2005).

Desta forma, o método PLS é o mais empregado método para regressão multivariada, mostrando-se eficiente em conjuntos de dados onde há muitas variáveis e estas com alta correlação acrescida de ruído aleatório. O método tem sido empregado

em diversas áreas de pesquisa e tecnológicas, como química analítica, ecologia, agricultura, ciência dos alimentos, medicina e industrial (SENA et al., 2005).

O desempenho dos modelos construídos é avaliado pelos valores do coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e do erro quadrático médio (RMSE) dos resíduos. RMSE é denominado erro quadrático médio de calibração (RMSEC), erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV) e erro quadrático médio de previsão (RMSEP).

### **1.6.3 Aplicação da quimiometria para quantificar fármacos em formulações farmacêuticas**

A espectroscopia no infravermelho e quimiometria provaram a sua eficácia analítica tanto qualitativamente quanto quantitativamente em diferentes campos de atuação, como: agricultura, alimentos, química e indústria do petróleo (ROGGO et al., 2007).

O uso da quimiometria nos ajuda a interpretar os resultados e melhorá-los matematicamente por reunir vários tópicos como planejamento de experimentos, informações sobre métodos de extração (modelagem e classificação) e técnicas que permitem a compreensão de mecanismos químicos (ROGGO et al., 2007).

Muitos estudos têm sido publicados nos últimos anos relativos à determinação do teor de compostos químicos, tais como API (ingrediente ativo farmacêutico), excipientes ou umidade em produtos farmacêuticos. As amostras podem ser de vários tipos, por exemplo, pós, granulados, comprimidos, líquidos, géis, filmes ou frascos liofilizados (ROGGO et al., 2007).

Um estudo de Chalus *et.al.*, 2005 compara diferentes dados de pré-tratamento e regressões para construir modelos de predição do ativo farmacêutico em comprimidos de baixa dosagem (CHALUS et al., 2005), outro estudo compara diferentes espectros para a determinação do ativo em comprimidos (ROGGO et al., 2007).

A Tabela 5 a seguir mostra os diversos trabalhos onde a quimiometria auxilia na quantificação do princípio ativo.

Tabela 5: Determinação quantitativa por espectroscopia no infravermelho.

Analito	Forma farmacêutica	Método de regressão	Pré-processamentos	Referência
Neomicina	Comprimidos	PLS	SNV e MSC	(SARRAGUÇA et al., 2011)
Amoxicilina	Suspensão	PLS	MSC	(SILVA et al., 2012)
Palmoato de pirantel, febantel e praziquantel	Comprimidos	siPLS	1ª derivada e MC	(PIANTAVINI et al., 2014)
Nimesulida	Pó	PLS	MSC	(ROCHA et al., 2010)
Vacinas contendo agente alergênico liofilizado	Pó liofilizado	PLS	2ª derivada	(ZHENG et al., 2008)
Dipirona	Solução oral	PLS	1ª e 2ª derivadas e MSC	(FERREIRA et al., 2009)
Heparina	Líquido	PLS	1ª e MC	(ZANG et al., 2013)
Vitamina B1	Comprimidos	PLS	SNV e MC	(MAZUREK ;SZOSTAK, 2012)
Sulfametoxazol e trimetoprima	Misturas de pós	iPLS	MSC, MC e auto escalonamento	(SILVA et al., 2009)
Hidroclorotiazida	Pó	PLS	1ª derivada, MSC e SNV	(FERREIRA et al., 2013)

Fonte: Do autor.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a estabilidade e atividade da formulação farmacêutica comercial (Lactaid® Fast Act 9000 U) contendo  $\beta$ -galactosidase como princípio ativo em diferentes condições de estabilidade e pH.

Desenvolver método analítico para quantificar o teor de lactase através da espectroscopia na região do infravermelho.

Testar a proteção gástrica para enzima  $\beta$ -galactosidase através de cápsulas gastro-resistentes e avaliar sua estabilidade e pH.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) Submeter o produto comercial às condições específicas de armazenamento, calor seco à 40 °C dentro e fora da embalagem primária, para estudos de estabilidade acelerada;
- b) Avaliar a atividade enzimática das amostras do produto comercial que estavam na estabilidade;
- c) Determinar o perfil de atividade enzimática do produto comercial em diferentes condições de pH à 37 °C através do teste de dissolução;
- d) Desenvolver um método para quantificação da  $\beta$ -galactosidase por espectroscopia no infravermelho;
- e) Testar a proteção gástrica para enzima  $\beta$ -galactosidase através de cápsulas gastro-resistentes;
- f) Determinar o perfil de atividade enzimática das cápsulas gastro-resistentes em diferentes condições de pH à 37 °C através do teste de dissolução;

- g) Determinar o perfil de atividade enzimática dos comprimidos comerciais em diferentes condições de pH à 37 °C através do teste de dissolução.

### 3 METODOLOGIA

A seguir a metodologia utilizada neste trabalho é apresentada. Primeiramente os reagentes, os equipamentos, o estudo de estabilidade acelerada, o desenvolvimento do método alternativo de quantificação de lactase por espectrofotometria na região do infravermelho e por fim, os estudos de dissolução *in vitro* comparativos das diferentes formas farmacêuticas estão detalhadamente relatados.

#### 3.1 REAGENTES

Os reagentes, solventes e padrões utilizados foram:

##### 3.1.1 Padrões, reagentes e solventes

- Ácido clorídrico (P.A. Labsynth®);
- Ácido acético glacial (P.A. Sigma Aldrich®);
- Água de laboratório tipo III;
- Cápsula gastro-resistente (Fagron®);
- Carbonato de sódio (P.A. anidro CAAL®);
- Excipientes farmacêuticos adquiridos de fornecedores qualificados (celulose microcristalina 102, citrato de sódio, croscarmelose, crospovidona, dióxido de silício coloidal, estearato de magnésio, manitol);
- Fosfato de sódio tribásico dodecahidratado (Vetec®);
- Hidróxido de sódio (micropérolas) (P.A. Vetec®);
- Lactase ( $\beta$ -galactosidase) (Sigma Aldrich®);
- O-nitrofenol-b-D-galactosídeo (ONPG) (Sigma Aldrich®);
- Soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 (Vetec®).

### 3.1.2 Equipamentos e acessórios

Os equipamentos e acessórios utilizados foram:

- Agitador de tubos Marconi® modelo MA 162;
- Banho de ultrassom Quimis®;
- Banho maria Novatécnica®;
- Balança analítica Shimadzu® modelo AY220;
- Dissolutor Nova Ética® modelo 299;
- Espectrofotômetro UV-visível Thermo Scientific® modelo Evolution 60;
- Espectrofotômetro FT-IR Thermo Scientific® modelo Nicolet iS50 com ATR Pike Technologies®;
- Estufa Novus® modelo N1040;
- Gral e pistilo;
- Medidor de pH Gehaka®;
- Pipetador automático SelectPette® de volume injetável 1000-5000 µL;
- Pipetador automático SelectPette® de volume injetável 100-1000 µL;
- Pipetador automático SelectPette® de volume injetável 20-200 µL;
- Purificador de água Gehaka®.

### 3.2 MÉTODOS

O primeiro estudo realizado foi a avaliação da estabilidade do produto comercial acondicionado na estufa a 40 °C sob calor seco durante 6 meses os estudos de dissolução *in vitro* comparando as diferentes formas farmacêuticas. E por fim, o desenvolvimento do método alternativo de quantificação de lactase por espectrofotometria na região do infravermelho.

### 3.2.1 Avaliação da estabilidade e da atividade enzimática do produto comercial

Para análise das influências dos fatores extrínsecos a enzima foi submetida a um estudo de estabilidade acelerada. Para isso, preparações da enzima foram analisadas com espectrofotometria UV-Vis de acordo com o método de referência da USP no tempo zero e após serem armazenadas a 40°C sem umidade, denominado condição a seco, depois de 3 e 6 meses na embalagem primária e em recipientes de acrílico tampados e vedados com fita parafilme.

#### 3.2.1.1 Teste de atividade enzimática

Primeiramente, o padrão de  $\beta$ -galactosidase foi analisado para a construção de curva de calibração na faixa de 230 a 630 U/L. Para isso, foi feita uma solução estoque 630 U/L. A solução de ONPG foi preparada com tampão acetato pH 4,5 com concentração de 3,7 mg/mL.

A reação consistia em transferir 2,0 mL da solução de substrato de ONPG para tubos de ensaios que eram incubados durante 10 minutos em um banho de água mantido a 37,0 $\pm$ 0,1°C. Após a incubação, adicionou-se rapidamente em cada tubo 0,5 mL das soluções do padrão de enzima. Em um dos tubos foi adicionado 0,5 mL de água destilada para ser utilizado como branco. Cada tubo foi agitado e incubado por mais 15 minutos no banho de água, mantido a mesma temperatura descrita anteriormente. Após este período foi adicionado 2,5 mL de solução de carbonato de sódio a 10% (m/v) a cada tubo de ensaio para cessar a reação enzimática. O conteúdo de cada tubo foi transferido para um béquer onde foram acrescentados 20,0 mL de água destilada. Após agitação, parte da amostra foi transferida para cubeta de acrílico e analisado no espectrofotômetro a 420 nm. (DIEKMANN et al., 2015).

O mesmo procedimento foi realizado para as amostras incubadas no tempo zero, 03 e 06 meses.

O padrão de  $\beta$ -galactosidase utilizado foi produzido pela Sigma-Aldrich, #SLBH5504V, 13,4 U/mg.

As amostras foram preparadas da seguinte forma: o peso médio dos comprimidos de Lactaid® Fast Act 9000 U é 269 mg. Assim para cada triplicata (dentro e fora da embalagem primária) foram pulverizados 2 comprimidos. Pesou-se 12,85 mg do pó, que é o equivalente a 430 U/L. Este foi transferido para balão volumétrico de 1 L e completado volume com água destilada. A seguir, transferiu-se 0,5 mL da solução de lactase para o tubo de ensaio onde ocorrerá a reação enzimática para avaliar a atividade da enzima.

O padrão de  $\beta$ -galactosidase, como também o produto disponível no mercado (Lactaid® Fast Act 9000 U, lote: 427565A, validade: 06/17) foram avaliados para determinação das condições em que o princípio ativo não sofre alterações qualitativamente e quantitativamente significativas. O espectrofotômetro Thermo Scientific® modelo Evolution 60 foi utilizado para determinação da atividade enzimática das amostras com  $\beta$ -galactosidase.

### 3.2.2 Avaliação de formulação gastro-resistente contendo $\beta$ -galactosidase e análise do perfil de dissolução

Para avaliar a formulação gastro-resistente de lactase utilizou-se como base a patente americana dos comprimidos de lactase (Lactaid® Original 3000 U) (KULKARNI et al., 2000) juntamente com informações contidas no Handbook of Pharmaceutical Excipients (ROWE et al., 2009).

Tabela 6: Proporções dos excipientes na formulação avaliada.

	<b>Lactase</b>	<b>Celulose Microcristalina</b>	<b>Estearato de Magnésio</b>	<b>Manitol</b>	<b>Citrato de sódio</b>
Função	API	Desintegrante	Lubrificante	Diluyente	Agente alcalinizante
[ ] dos excipientes_patente	9,6%	30%	1%	59,4%	-
[ ] dos excipientes_Handbook	-	20-90%	0,25-5,0%	10-90%	0,3-2,0%
[ ] dos excipientes_formulação teste	62%	12%	1,0%	23%	2,0%

Fonte: Do autor.

### 3.2.2.1 Teste de dissolução comparativo e análise da atividade enzimática

Realizou-se o teste de dissolução para o produto comercial seguindo o método recomendado pela Farmacopéia Brasileira 5ª Edição que utiliza o aparato 2 (pás) com rotação de 75 rpm. Onde, primeiramente, deixou-se os comprimidos por 2 horas em meio ácido (750 mL HCl 0,1 M) seguido pela etapa básica com 250 mL de solução de fosfato de sódio tribásico 0,2 M pH 6,8 por 45 minutos a 37 °C (ANVISA, 2010).

Foram retiradas alíquotas de 1 mL no início do teste, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minutos para posterior análise da atividade enzimática para avaliar a capacidade da formulação comercial de proteger a enzima.

Para a avaliação da forma farmacêutica de cápsulas gastro-resistente foi desenvolvido um novo método de dissolução que atendesse às características da formulação.

Assim, utilizou-se o aparato 1 (cesto) com rotação de 100 rpm. Onde, primeiramente, deixou-se as cápsulas por 2 horas em meio ácido (750 mL HCl 0,1 M) e então as cápsulas foram retiradas e colocadas em cubas contendo 750 mL de tampão acetato de sódio pH 4,5 por 2 horas a 37 °C.

Foram retiradas alíquotas de 1 mL no início do teste, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos para posterior análise da atividade enzimática para avaliar a capacidade da cápsula de proteger a enzima no meio ácido.

### 3.2.3 Espectrofotometria IV e técnicas quimiométricas para quantificação da $\beta$ -galactosidase em formulações farmacêuticas

O preparo da amostra consistia em pesar 30 mg de peso total de pó contendo o princípio ativo (lactase Sigma-Aldrich, #SLBH5504V, 13,4 U/mg ) mais os excipientes utilizados na formulação comercial do Lactaid® Fast Act 9000 U (celulose microcristalina 102 (28%), estearato de magnésio (1,0%), croscarmelose (2,0%), crospovidona (2,5%) e dióxido de silício coloidal (0,5%). As amostras foram pesadas seguindo uma faixa de 80 a 120 % de teor de lactase (níveis baixo, médio e alto de

concentração) em balança analítica. Foram preparadas 100 amostras. Cada amostra foi pesada e acondicionada em tubos *ependorfs* e seladas com fita parafilme.

### 3.2.3.1 Espectroscopia IV e análise multivariada

Antes de realizar as leituras no espectrofotômetro, foi feito um teste para avaliar a influência da homogeneidade das misturas na leitura da absorbância. Para isso utilizou-se uma concentração alta (120%) e baixa (80%) do teor de lactase e, em seguida, foram avaliados os espectros em quintuplicata nos tempos de agitação de 1, 5, 10 e 15 minutos.

Para a leitura no espectrofotômetro IV era retirada aleatoriamente uma parte da amostra de dentro do tubo *ependorf* e homogeneizada em vórtex por 5 minutos (tempo ideal determinado pelo teste de homogeneidade). Cada *ependorf* era analisado em triplicada, totalizando 300 amostras, e o número de onda utilizada era de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , número de scans 128 com ganho de 8. Durante as medidas a temperatura da sala foi controlada entre 20-25 °C.

Depois de adquirir os espectros, os dados foram tratados utilizando o software OMNIC 9 Thermo Scientific, ORIGIN PRO 9.0 64 Bits, MATLAB (versão 7.0, The MathWorks) utilizando o PLS Toolbox 5.8 (Eigenvector Co.) para a construção do modelo de calibração ideal. Diferentes pré-processos foram utilizados a fim de encontrar o modelo ideal com uma alta habilidade de predição. A habilidade de predição do modelo foi avaliada seguindo os critérios de RMSECV, RMSEP e  $R^2$ .

Uma vez que o modelo de calibração foi desenvolvido e predições exatas são esperadas, o método deve ser validado para que possa ser utilizado em rotinas de laboratórios. Para isso, amostras que não foram usadas na calibração foram necessárias para a validação e passaram pela mesma técnica utilizada na construção do modelo.

A validação foi feita utilizando o guia ICH onde os parâmetros: precisão, exatidão e linearidade foram avaliadas.

Para comprovar que o método desenvolvido é eficaz, através da porcentagem de teor, comparamos os dados obtidos com o MIR com os dados obtidos pelo método USP de referência (reação colorimétrica através do substrato ONPG)

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão deste trabalho são apresentados a seguir.

### 4.1 ESTUDO DE ESTABILIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A análise da atividade enzimática foi realizada com intuito de avaliar a influência do calor na atividade da  $\beta$ -galactosidase.

Inicialmente, procedeu-se a construção da curva de calibração considerando a concentração da amostra (eixo x) e a resposta do sistema – absorbância (eixo y), onde x corresponde à concentração da  $\beta$ -galactosidase e y corresponde a absorbância, obtido nas seguintes concentrações: 230,00; 330,00; 430,00; 530,00; 630,00 U/L. Cada concentração foi analisada em triplicata. Foram calculados os desvios padrão, o coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e os limites de quantificação ( $3xD.P.R/a$ ) e detecção ( $10xD.P.R/a$ ) (Figura 8 e Tabelas 7 e 8).

Tabela 7: Dados da construção da curva analítica utilizada para determinar a atividade enzimática das amostras que estão na estabilidade acelerada.

Padrões (U/L)	Replicatas (Abs)			Média (Abs)	Desvio padrão	C.V. (%)
	1	2	3			
230	0,373	0,369	0,351	0,369	0,009	2,593
330	0,498	0,490	0,494	0,494	0,003	0,661
430	0,671	0,654	0,675	0,671	0,009	1,357
530	0,840	0,812	0,806	0,812	0,0148	1,825
630	0,987	0,979	0,997	0,987	0,007	0,746

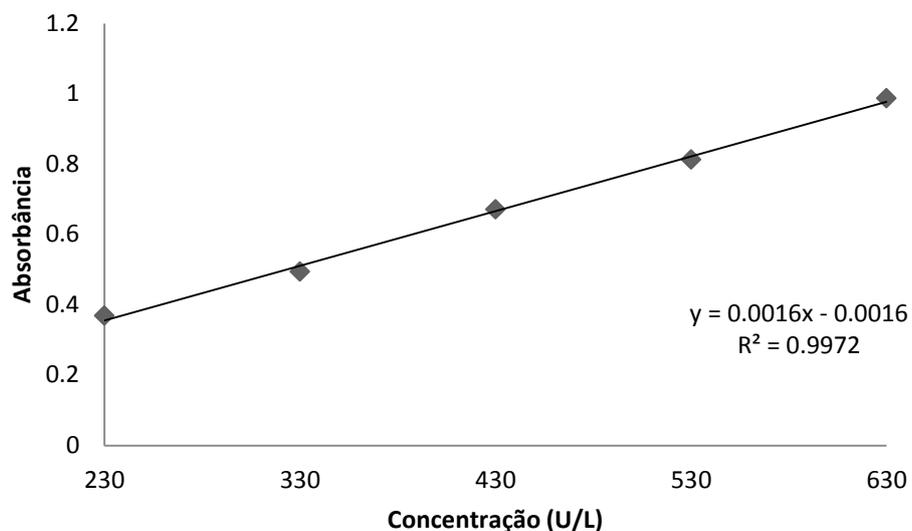
Fonte: Do autor.

Tabela 8: Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD).

Absorbância do branco (média)	Desvio padrão	LQ (U/L)	LD (U/L)
0,001	0,001	3,019	0,905

Fonte: Do autor.

Figura 8: Curva analítica utilizada para determinar a atividade enzimática das amostras que estão na estabilidade acelerada.



Fonte: Do autor.

Nas tabelas a seguir estão os resultados das análises de absorbância (Tabela 9) e da atividade enzimática (Tabela 10) das amostras no tempo zero de estabilidade por espectroscopia UV-Vis.

Tabela 9: Análise da absorbância das amostras no tempo zero da estabilidade acelerada.

Amostras	Replicatas (Abs)			Média (Abs)	Desvio padrão	C.V (%)
	1	2	3			
1	0,620	0,622	0,623	0,622	0,001	0,200
2	0,604	0,600	0,606	0,604	0,002	0,413
3	0,579	0,580	0,585	0,580	0,003	0,452

Fonte: Do autor.

Tabela 10: Análise da atividade enzimática das amostras no tempo zero da estabilidade acelerada.

Amostras	Concentração	% de	% de perda
	encontrada (U/L)	atividade	de atividade
1	389,750	90,640	9,360
2	378,500	88,020	11,980
3	363,500	84,530	15,470
Média	377,250	88,020	12,270

Fonte: Do autor.

As quantidades de  $\beta$ -galactosidase presente no produto comercial analisadas no tempo zero (condição de não stress) apresentaram atividade enzimática média de  $88,02 \pm 2,5$  %. Assim, houve uma perda de atividade de 12,27%.

Esta perda de atividade no tempo zero pode ser atribuída às condições de transporte e armazenamento, em que a temperatura e a umidade relativa não é controlada.

Nas tabelas a seguir estão os resultados das análises de absorvância (Tabela 11) e da atividade enzimática (Tabela 12) das amostras dentro da embalagem primária de 3 meses da estabilidade por espectroscopia UV-Vis.

Tabela 11: Análise da absorvância das amostras dentro da embalagem primária de 3 meses da estabilidade acelerada.

Amostras	Replicatas (Abs)			Média (Abs)	Desvio padrão	C.V (%)
	1	2	3			
1	0,569	0,564	0,567	0,567	0,002	0,362
2	0,561	0,563	0,565	0,563	0,002	0,290
3	0,560	0,559	0,564	0,560	0,002	0,386

Fonte: Do autor.

Tabela 12: Análise da atividade enzimática das amostras dentro da embalagem primária de 3 meses de estabilidade acelerada.

Amostras	Concentração	% de	% de perda
	encontrada (U/L)	atividade	de atividade
1	355,370	82,640	5,360
2	352,870	82,060	5,940
3	351,000	81,630	6,370
Média	353,080	82,060	5,890

Fonte: Do autor.

As quantidades de  $\beta$ -galactosidase presente no produto comercial analisadas no tempo de 3 meses dentro da embalagem primária apresentaram atividade enzimática média de  $82,06 \pm 0,41\%$ . Assim, houve uma perda de atividade de  $5,89\%$ .

Nas tabelas a seguir estão os resultados das análises de absorvância (Tabela 13) e da atividade enzimática (Tabela 14) das amostras fora da embalagem primária de 3 meses da estabilidade por espectroscopia UV-Vis.

Tabela 13: Análise da absorvância das amostras fora da embalagem primária de 3 meses da estabilidade acelerada.

Amostras	Replicatas (Abs)			Média (Abs)	Desvio padrão	C.V (%)
	1	2	3			
1	0,497	0,500	0,503	0,500	0,002	0,424
2	0,507	0,510	0,513	0,510	0,002	0,416
3	0,507	0,513	0,518	0,513	0,004	0,760

Fonte: Do autor.

Tabela 14: Análise da atividade enzimática das amostras fora da embalagem primária de 3 meses de estabilidade acelerada.

Amostras	Concentração	% de	% de perda
	encontrada (U/L)	atividade	de atividade
1	313,500	72,900	15,100
2	319,750	74,360	13,610
3	321,620	74,800	13,200
Média	318,290	74,360	13,970

Fonte: Do autor.

As quantidades de  $\beta$ -galactosidase presente no produto comercial analisadas no tempo de 3 meses fora da embalagem primária apresentaram atividade enzimática média de  $74,36 \pm 0,8\%$ . Assim, houve uma perda de atividade de  $13,97\%$

Nas tabelas a seguir estão os resultados das análises de absorvância (Tabela 15) e da atividade enzimática (Tabela 16) das amostras dentro da embalagem primária de 6 meses da estabilidade por espectroscopia UV-Vis.

Tabela 15: Análise da absorvância das amostras dentro da embalagem primária de 6 meses da estabilidade acelerada.

Amostras	Replicatas (Abs)			Média (Abs)	Desvio padrão	C.V (%)
	1	2	3			
1	0,555	0,558	0,553	0,555	0,002	0,321
2	0,540	0,546	0,545	0,545	0,002	0,430
3	0,557	0,556	0,553	0,556	0,001	0,270

Fonte: Do autor.

Tabela 16: Análise da atividade enzimática das amostras dentro da embalagem primária de 6 meses de estabilidade acelerada.

Amostras	Concentração	% de	% de perda
	encontrada (U/L)	atividade	de atividade
1	347,870	80,900	7,100
2	341,620	79,450	8,550
3	348,500	81,050	6,950
Média	346,000	80,900	7,533

Fonte: Do autor.

As quantidades de  $\beta$ -galactosidase presente no produto comercial analisadas no tempo de 6 meses dentro da embalagem primária apresentaram atividade enzimática média de  $80,9 \pm 0,72$  %. Assim, houve uma perda de atividade de 7,53%.

Nas tabelas a seguir estão os resultados das análises de absorbância (Tabela 17) e da atividade enzimática (Tabela 18) das amostras fora da embalagem primária de 6 meses da estabilidade por espectroscopia UV-Vis.

Tabela 17: Análise da absorbância das amostras fora da embalagem primária de 6 meses da estabilidade acelerada.

Amostras	Replicatas (Abs)			Média (Abs)	Desvio padrão	C.V (%)
	1	2	3			
1	0,475	0,463	0,46	0,463	0,006	1,244
2	0,410	0,410	0,412	0,410	0,001	0,211
3	0,443	0,437	0,443	0,443	0,003	0,586

Fonte: Do autor.

Tabela 18: Análise da atividade enzimática das amostras fora da embalagem primária de 6 meses de estabilidade acelerada.

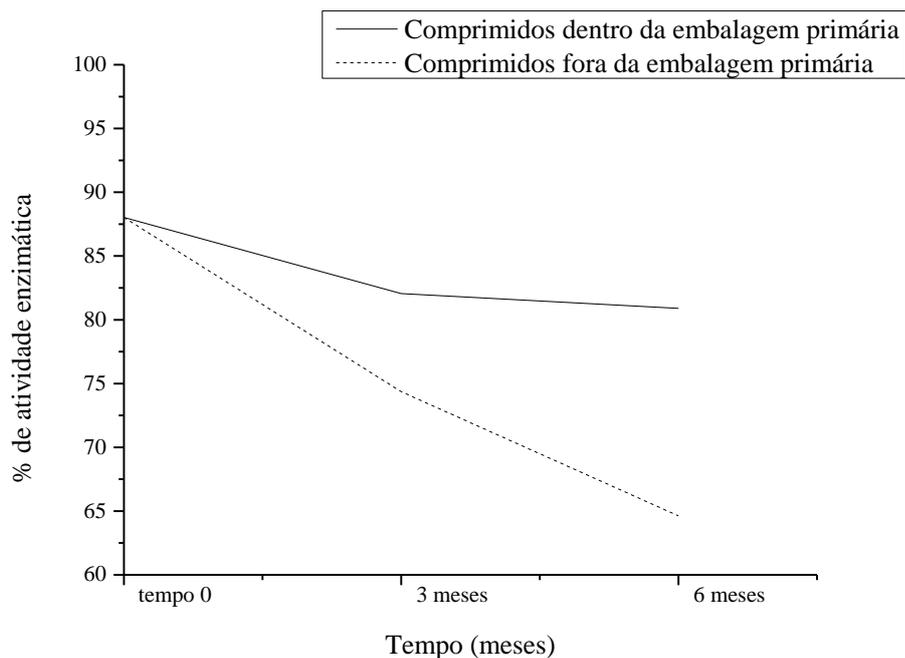
Amostras	Concentração	% de	% de perda
	encontrada (U/L)	atividade	de atividade
1	290,370	67,530	32,470
2	257,770	59,920	40,080
3	277,870	64,620	35,380
Média	275,330	64,020	35,980

Fonte: Do autor.

As quantidades de  $\beta$ -galactosidase presente no produto comercial analisadas no tempo de 6 meses fora da embalagem primária apresentaram atividade enzimática média de  $64,02 \pm 3,1\%$ . Assim, houve uma perda de atividade de 35,98%.

Assim, de acordo com a Figura 9, é possível ter uma melhor visualização da perda de atividade ao longo do estudo.

Figura 9: Atividade enzimática dos comprimidos de Lactaid® Fast Act 9000 U ao longo do estudo de estabilidade.



Fonte: Do autor.

Em vista dos resultados apresentados anteriormente, nota-se que a embalagem primária é fundamental na manutenção da atividade enzimática da lactase. Ao término do estudo de estabilidade, os comprimidos que estavam dentro da sua embalagem primária tiveram uma diminuição da sua atividade de aproximadamente 7,53%, enquanto os comprimidos que foram armazenados fora da sua embalagem original tiveram uma perda de aproximadamente 35,0%.

A perda de 7,53 % da atividade enzimática dentro da embalagem também se deve ao fato da enzima ser estável em temperaturas até 50 °C, e nossa temperatura de estudo foi 40 °C, que mimetiza a condição encontrada em caminhões transportadores de medicamentos.

## 4.2 ANÁLISE DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DAS FORMAS FARMACÊUTICAS

Inicialmente, procedeu-se a construção da curva de calibração considerando a atividade enzimática (eixo x) e a resposta do sistema – absorbância (eixo y), onde x corresponde à atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase e y corresponde a absorbância, obtido nas seguintes concentrações: 1000,0; 2000,0; 3000,0; 4000,0; 5000,0 U/L. Cada concentração foi analisada em triplicata. Foram calculados o desvio padrão, o coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e os limites de quantificação e detecção (Figura 10, Tabelas 19 e 20).

Tabela 19: Dados da construção da curva analítica utilizada para determinar a atividade enzimática das amostras do teste de dissolução.

Padrões (U/L)	Replicatas (Abs)			Média (Abs)	Desvio padrão	C.V. (%)
	1	2	3			
1	0,028	0,027	0,028	0,028	0,001	1,683
2	0,047	0,047	0,048	0,047	0,001	1,003
3	0,065	0,066	0,066	0,066	0,001	0,714
4	0,077	0,077	0,078	0,077	0,001	0,612
5	0,084	0,082	0,083	0,083	0,001	0,984

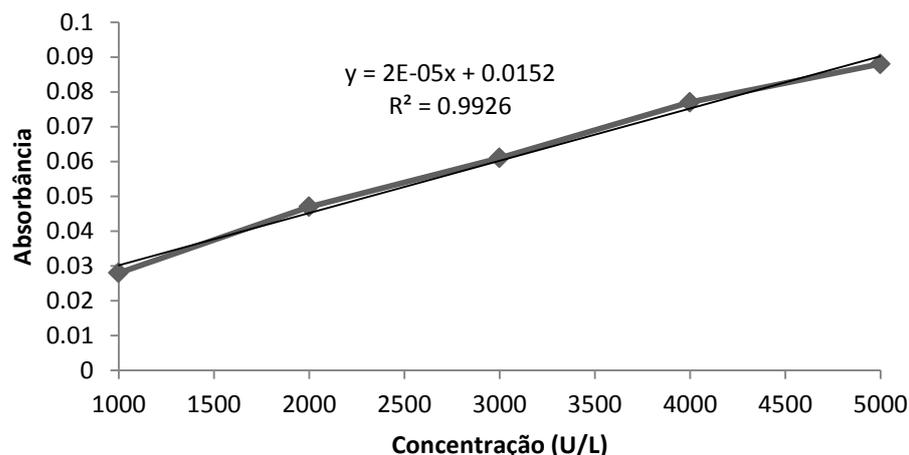
Fonte: Do autor.

Tabela 20: Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD).

Absorbância do branco (média)	Desvio padrão	LQ (U/L)	LD (U/L)
0,001	0,001	0,667	0,200

Fonte: Do autor.

Figura 10: Curva analítica utilizada para determinar a atividade enzimática das amostras do teste de dissolução.



Fonte: Do autor.

Foi feito primeiramente a análise dos comprimidos Lactaid® Original 3000 U e notou-se que o tempo de desintegração dos comprimidos foi cerca de 2 minutos, o que revela que os comprimidos foram desenvolvidos para terem uma liberação imediata. O que também se comprova avaliando os excipientes utilizados na sua preparação; nenhum excipiente (celulose microcristalina, manitol, estearato de magnésio e citrato de sódio) é responsável por ter uma liberação retardada ou de proteção da enzima do pH ácido do estômago.

Nas tabelas a seguir estão os resultados das análises de absorbância (Tabela 21) e da atividade enzimática (Tabela 22) dos comprimidos do produto comercial por espectroscopia UV-Vis.

Tabela 21: Análise da absorbância do estudo de dissolução das amostras dos comprimidos comerciais americanos.

Cubas/Tempo (min)	30	60	90	120	150	180
1	0,053	0,050	0,043	0,043	0,037	0,027
2	0,054	0,049	0,043	0,041	0,037	0,028
3	0,053	0,046	0,045	0,042	0,038	0,029
4	0,053	0,049	0,043	0,042	0,036	0,027
5	0,051	0,049	0,044	0,041	0,036	0,027
6	0,054	0,047	0,043	0,041	0,037	0,027
Média das absorbâncias	0,053	0,049	0,043	0,041	0,037	0,027
D.P.R.	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
C.V. (%)	1,888	2,804	1,776	1,796	1,857	2,829

Fonte: Do autor.

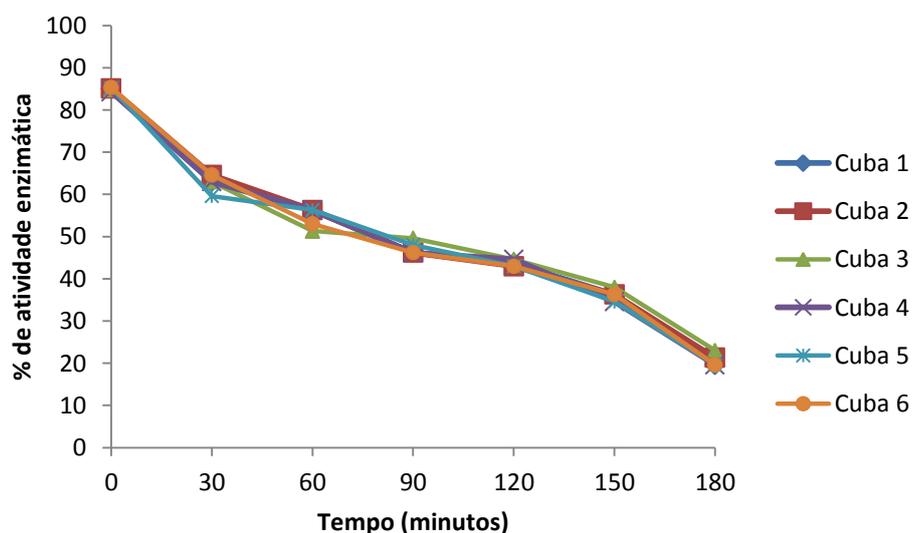
Tabela 22: Análise da atividade enzimática do estudo de dissolução das amostras dos comprimidos comerciais americanos.

Etapas da dissolução	% de atividade enzimática					
	1	2	3	4	5	6
5 min (pH 1,2)	85,1	85,1	84,8	84,3	85,2	85,3
30 min (pH 1,2)	63,0	64,6	63,0	63,0	59,6	64,6
60 min (pH 1,2)	56,2	56,3	51,3	56,3	56,3	53,0
90 min (pH 1,2)	46,2	46,2	49,6	46,2	48,0	46,2
120 min (pH 1,2)	43,7	43,0	44,6	44,6	43,0	43,0
150 min (pH 6,8)	36,3	36,3	38,0	34,6	34,6	36,3
180 min (pH 6,8)	19,6	21,3	23,0	19,6	19,6	19,6
% de perda de atividade	65,5	63,8	61,8	64,7	65,6	65,7

Fonte: Do autor.

Ao analisar a tabela 22, notamos que a formulação comercial não apresenta proteção gástrica porque a enzima é liberada logo no início da dissolução apresentando sinal no espectrofotômetro. Portanto, como não há uma proteção da lactase a atividade enzimática decresce conforme o tempo do teste avança, como pode ser visto pela figura 11.

Figura 11: Curva decrescente da atividade enzimática durante o estudo de dissolução dos comprimidos comerciais.



Fonte: Do autor.

O mesmo teste feito para o produto comercial também foi realizado para a forma farmacêutica de cápsula de liberação retardada.

Nas tabelas a seguir estão os resultados das análises de absorvância (Tabela 23) e da atividade enzimática (Tabela 24) das cápsulas gastro-resistentes por espectroscopia UV-Vis.

Tabela 23: Análise da absorvância do estudo de dissolução das amostras das cápsulas gastro-resistentes.

Cubas/Tempo (min)	30	60	90	120	150	180	210
1	0	0	0	0,0154	0,0157	0,040	0,070
2	0	0	0	0,0153	0,0156	0,042	0,073
3	0	0	0	0,0153	0,0154	0,040	0,071
4	0	0	0	0,0153	0,0155	0,041	0,070
5	0	0	0	0,0154	0,0156	0,040	0,071
6	0	0	0	0,0152	0,0155	0,042	0,072
Média das absorvâncias	0	0	0	0,0153	0,0156	0,040	0,071
D.P.R.	0	0	0	0,000069	0,000096	0,000898	0,001067
C.V. (%)	0	0	0	0,450	0,616	2,216	1,500

Fonte: Do autor.

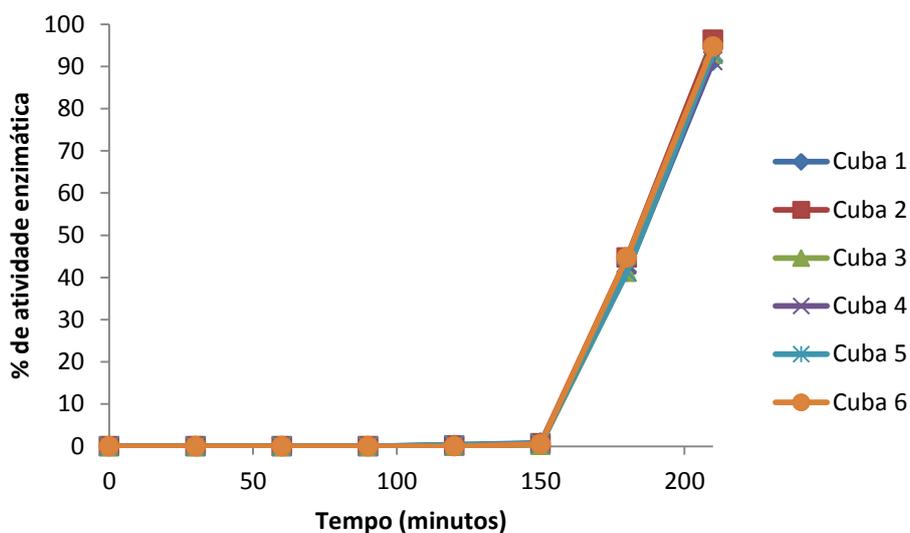
Tabela 24: Análise da atividade enzimática do estudo de dissolução das amostras das cápsulas gastro-resistentes.

Etapas da dissolução	% de atividade enzimática					
	1	2	3	4	5	6
30 min (pH 1,2)	0	0	0	0	0	0
60 min (pH 1,2)	0	0	0	0	0	0
90 min (pH 1,2)	0	0	0	0	0	0
120 min (pH 1,2)	0,325	0,167	0,167	0,167	0,325	0
150 min (pH 4,5)	0,833	0,666	0,325	0,5	0,666	0,5
180 min (pH 4,5)	41,3	44,67	41,3	43,0	41,3	44,67
210 min (pH 4,5)	91,3	96,3	93,0	91,3	93,0	94,67
% de perda de atividade	8,7	3,7	7,0	8,7	7,0	5,33

Fonte: Do autor.

Ao analisar a tabela 30, notamos que a formulação avaliada apresenta proteção gástrica porque a enzima não é liberada no início da dissolução, logo não apresenta sinal no espectrofotômetro. Portanto, como há uma proteção da lactase a atividade enzimática aumenta conforme o tempo do teste avança, como pode ser visto pela figura 12.

Figura 12: Curva crescente da atividade enzimática das cápsulas gastro-resistentes durante o ensaio de dissolução.



Fonte: Do autor.

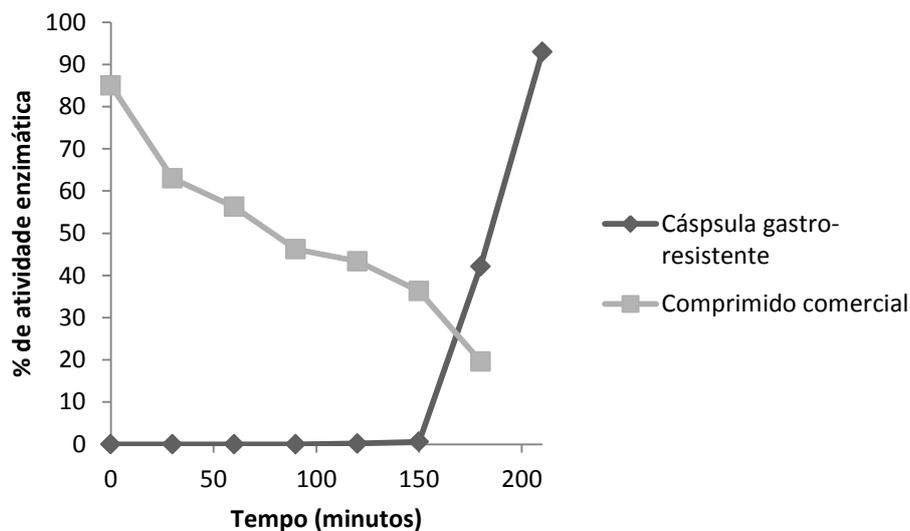
Observando a tabela 25 e a sobreposição dos gráficos do produto comercial e da formulação gastro-resistente (Figura 13) nota-se que ao atingir a etapa básica (120-210 min) ocorre uma inversão das linhas. A atividade enzimática do produto comercial continua a decair e a atividade da formulação gastro-resistente começa a aumentar devido à cápsula de hipromelose se desintegrar em pH 4,5 (pH ótimo da enzima) e liberar a lactase para o meio de dissolução.

Tabela 25: Atividade enzimática do produto comercial e da formulação gastro-resistente.

Tempo (minutos)	Cápsula gastro-resistente (% de liberação)	Comprimido comercial (% de liberação)
5	0	85,05
30	0	63,0
60	0	56,25
90	0	46,2
120	0,167	43,35
150	0,583	36,3
180	42,15	19,6
210	93,0	-

Fonte: Do autor.

Figura 13: Gráfico da atividade enzimática do produto comercial e da formulação gastro-resistente.



Fonte: Do autor.

Antes de iniciar a discussão sobre o método analítico de quantificação, uma importante etapa é o planejamento das amostras, onde estabelecemos a quantidade de princípio ativo (teor) e as quantidades de excipientes que irão variar durante a pesagem das amostras, e como parte deste planejamento está inserido o teste de homogeneidade.

### 4.3 MÉTODO ANALÍTICO DE ANÁLISE MULTIVARIADA

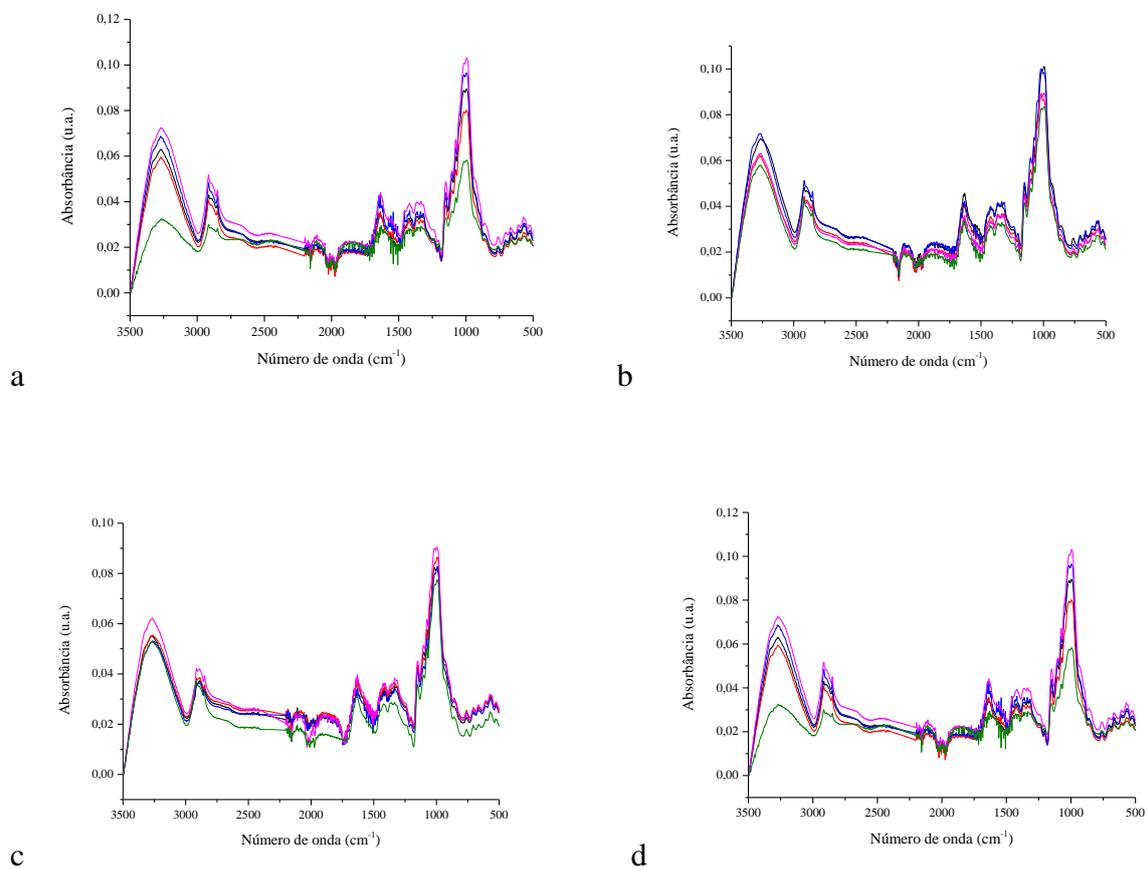
#### 4.3.1 Teste de homogeneidade de misturas

É através do teste de homogeneidade que garante a eficácia da mistura dos componentes (excipientes + princípio ativo) (EL-HAGRASY et al., 2001). As figuras 14 e 15 apresentam uma análise visual em quintuplicatas dos espectros de infravermelho em diferentes concentrações do princípio ativo (concentração mínima do ativo (80%) e concentração máxima do ativo (120%) e em diferentes tempos de agitação.

Ao observar as figuras abaixo, nota-se que a repetibilidade das quintuplicatas ficaram melhor evidenciadas no tempo de agitação de 5 minutos. Também se pode

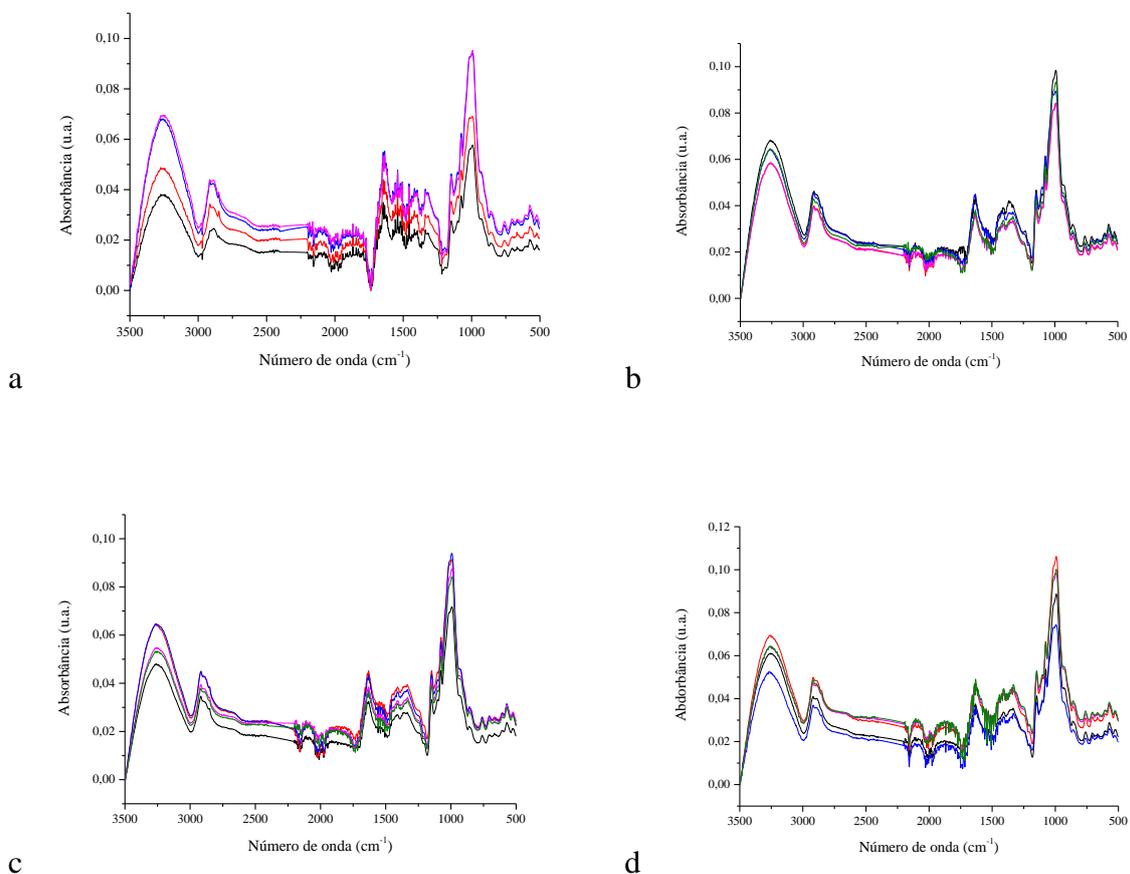
notar que o melhor tempo de agitação foi de 5 minutos através da realização da média dos desvios padrões das quintuplicatas (Tabela 26).

Figura 14: Quantidade mínima de lactase na formulação com diferentes tempos de agitação: 1 minuto (a), 5 minutos (b), 10 minutos (c) e 15 minutos (d).



Fonte: Do autor.

Figura 15: Quantidade máxima de lactase na formulação com diferentes tempos de agitação: 1 minuto (a), 5 minutos (b), 10 minutos (c) e 15 minutos (d).



Fonte: Do autor.

Para se obter os resultados presentes na tabela a seguir foram realizadas as leituras da absorbância em todos os números de ondas (4000-400 cm<sup>-1</sup> com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>) em quintuplicatas das concentrações mínima e máxima da enzima nos diferentes tempos de agitação descritos anteriormente, calculado o desvio padrão para cada região do infravermelho e feito a média destes desvios para posterior análise estatística.

Tabela 26: Média dos desvios padrões das quintuplicatas do teste de homogeneidade de misturas.

<b>Tempo de agitação (min)</b>	<b>D.P.R. das concentrações mínimas do ativo</b>	<b>D.P.R. das concentrações máximas do ativo</b>
1	0,002958	0,006236
5	0,002495	0,002336
10	0,002928	0,003526
15	0,004428	0,005136

Fonte: Do autor.

Analisando os resultados através das medições do IV das amostras em diferentes concentrações e dos desvios padrões dos diferentes tempos de agitação, conclui-se que a homogeneidade é, de fato, uma etapa prévia importante antes de obter os espectros que serão utilizados na análise multivariada.

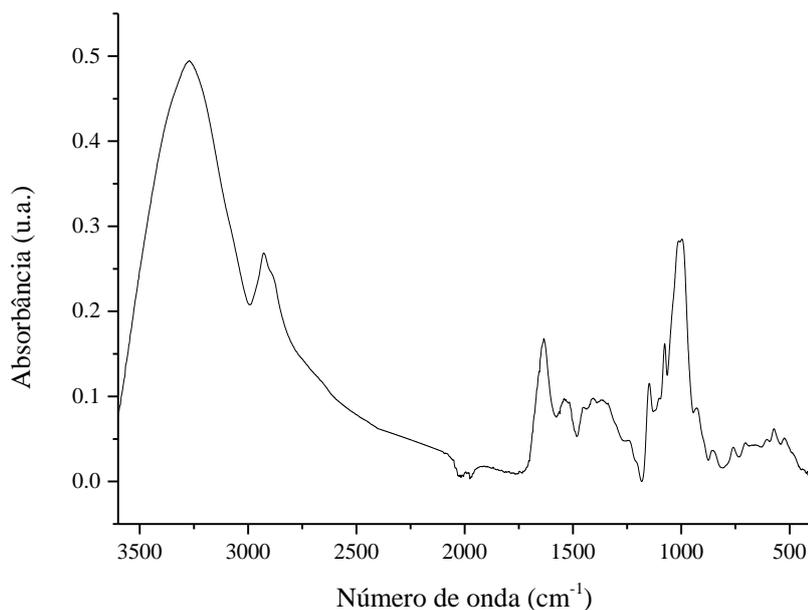
Assim, ao garantir uma boa homogeneização, a mistura entre biofármaco e excipientes atinge um nível ótimo e não apresenta segregação de partículas que poderia inviabilizar todo o estudo de quantificação do ativo através de IV.

Isso porque quando ocorre segregação, proveniente de mistura em excesso, as partes retiradas da amostra para a leitura do espectro de IV não apresentam quantidades iguais de fármaco e excipientes e acaba se tornando não reprodutível as triplicatas.

#### **4.3.2 Análise quantitativa de $\beta$ -galactosidase**

A reflectância atenuada do espectro de infravermelho do pó de lactase pura está apresentada na figura 16. Uma análise qualitativa desta figura ajuda a destacar as bandas das regiões que mais podem contribuir para os modelos preditivos (FERREIRA et al., 2013).

Figura 16: Espectro de infravermelho de lactase pura.



Fonte: Do autor.

As bandas observadas entre 1640 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  são características da enzima  $\beta$ -galactosidase. Onde entre 1700 a 1590  $\text{cm}^{-1}$  é referente à amida I de proteínas (MANTSCH ;CHAPMAN, 1996).

Foram realizadas as leituras no espectrofotômetro das 100 amostras de formulação de lactase com variação na concentração do princípio ativo. Cada leitura era feita em triplicata e a média das leituras era utilizada para montar o modelo de calibração.

As amostras de calibração foram selecionadas de modo a assegurar a representação e distribuição homogênea do conteúdo de lactase.

Neste trabalho, as técnicas de pré-processamento testados foram: utilizando o software OMNIC, os pré-processamentos dos espectros foram a suavização dos ruídos entre 4000-3600  $\text{cm}^{-1}$  provenientes da umidade do ambiente, a suavização da banda de  $\text{CO}_2$  entre 2400-2200  $\text{cm}^{-1}$  e a correção da linha de base.

Através da tabela 27 pode-se afirmar que a utilização desses pré-processamentos acima citados foram úteis para diminuir o desvio padrão entre as leituras.

Tabela 27: Média dos desvios padrões das quintuplicatas dos dados processados e não processados.

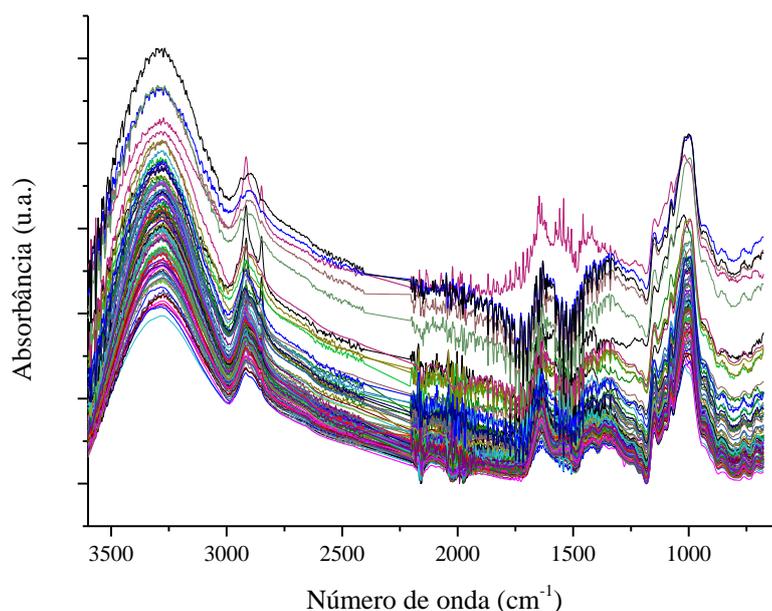
Tempo de agitação (min)	D.P.R. dos dados não processados	D.P.R. dos dados processados
1	0,008843	0,006236
5	0,003812	0,002336
10	0,00348	0,003526
15	0,007355	0,005136

Fonte: Do autor.

Utilizando o software MATLAB, os pré-processamentos para as matrizes X e Y, sinal e concentração, respectivamente, utilizou-se a primeira derivada e auto escalonamento.

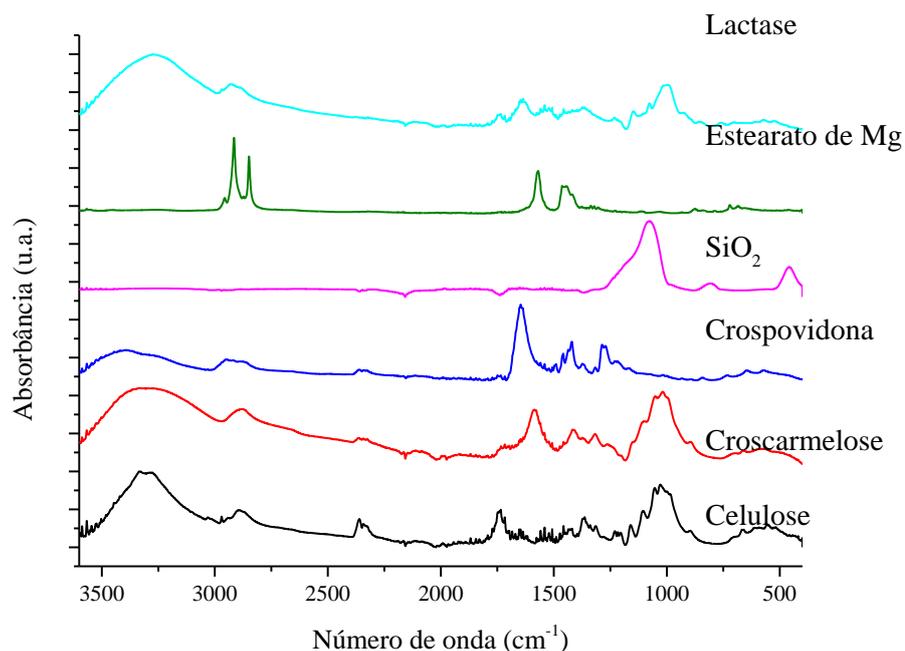
Para analisar as 100 amostras (Figura 17) utilizou-se o modelo de PLS (*Partial Least Squares*), pois o espectro de infravermelho da lactase não apresenta nenhuma banda característica que a difere dos demais componentes da formulação, como pode ser visto através da figura 18. E para achar o melhor número de variáveis latentes foi empregado a Validação Cruzada (*Cross Validation*) com *leave-one-out* que permite que o modelo se ajuste a todas as amostras e sirva como modelo global capaz de analisar amostras desconhecidas.

Figura 17: Espectros de infravermelho das 100 amostras de formulação de lactase utilizadas para preparar o modelo de calibração.



Fonte: Do autor.

Figura 18: Espectros de infravermelho de todos os componentes presentes na amostra.



Fonte: Do autor.

O desempenho dos modelos construídos é avaliado pelos vetores de coeficiente de regressão ( $R^2$ ), do erro quadrático médio da validação cruzada (RMSECV) e erro quadrático médio de calibração (RMSEC).

A detecção de *outliers* é tão importante quanto a determinação do número de componentes principais que serão empregadas no modelo. Ao verificar a qualidade do conjunto de calibração, deve-se assegurar de que as amostras formam um conjunto homogêneo, removendo-se aquelas amostras que são solitárias. Para a detecção de "outliers", usa-se duas grandezas complementares: *leverage* e resíduos de Student (FERREIRA et.al., 1999).

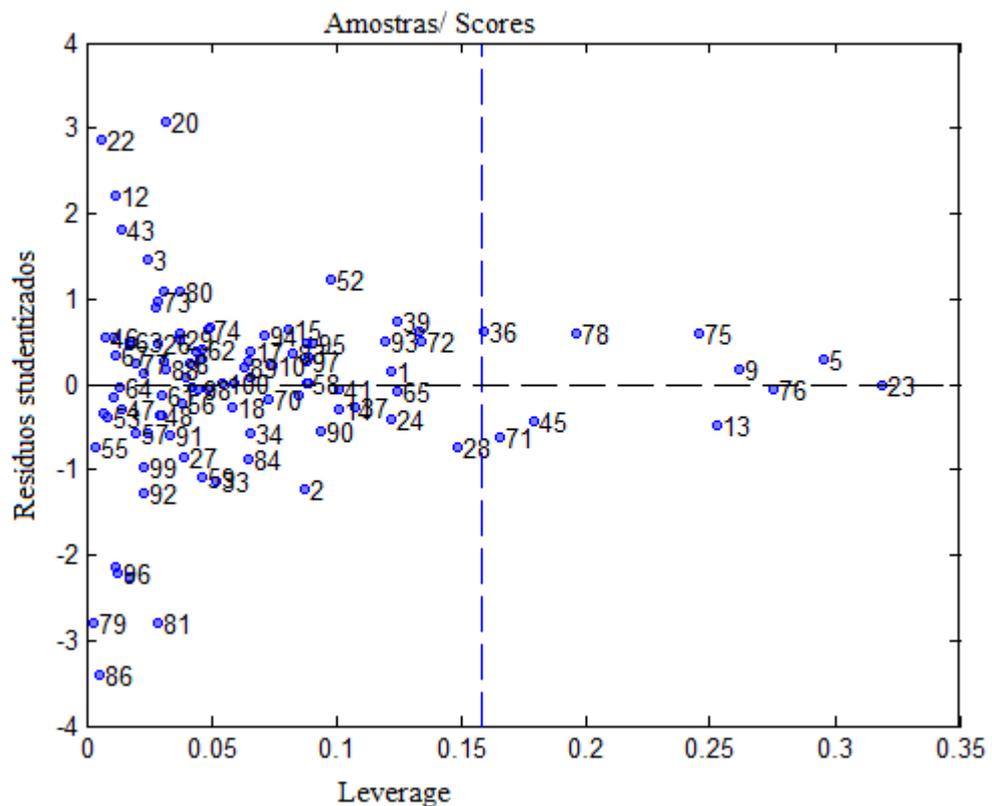
A *leverage* é uma medida da influência de uma amostra no modelo de regressão. Um valor de "leverage" pequeno indica que a amostra em questão influencia pouco na construção do modelo de calibração. Por outro lado, se as medidas experimentais de uma amostra são diferentes das outras do conjunto de calibração, ela provavelmente terá uma alta influência no modelo, que pode ser negativa. Em geral, estas amostras solitárias estão visíveis no gráfico de *scores* (FERREIRA et.al., 1999).

Como os resíduos de Student são definidos em unidades de desvio padrão do valor médio, os valores além de  $\pm 2,5$  são considerados altos sob as condições usuais da estatística (FERREIRA et.al., 1999).

A análise do gráfico dos resíduos de Student versus *leverage* para cada amostra é a melhor maneira de se determinar as amostras anômalas. Amostras com altos resíduos mas com pequena *leverage* provavelmente têm algum erro no valor da concentração, que deve, de preferência, ser medida novamente. Outra opção será a exclusão de tal amostra do conjunto de calibração. Amostras com resíduo e *leverage* altos devem sempre ser excluídas e o modelo de calibração reconstruído (FERREIRA et.al., 1999).

A seguir o gráfico (Figura 19) dos resíduos de Student versus *leverage* para as 100 amostras da calibração.

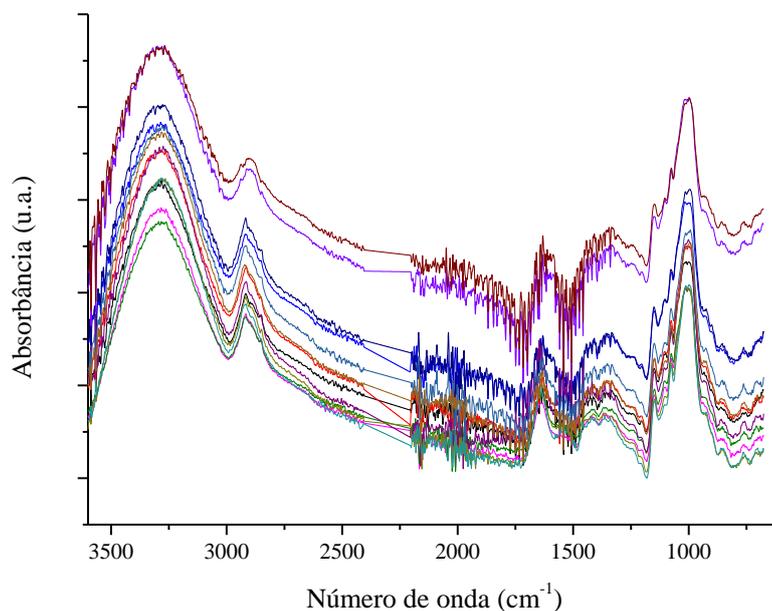
Figura 19: Resíduos de Student versus *leverage* para as 100 amostras da calibração.



Fonte: Do autor.

Após a seleção dos dados e de construir vários modelos, o melhor modelo foi utilizando 66 amostras para a construção do modelo de calibração (Figura 20).

Figura 20: Espectros de infravermelho das 66 amostras de formulação de lactase utilizadas para preparar o modelo de calibração.



Fonte: Do autor.

Como mostra a tabela 28, o melhor modelo de PLS construído foi utilizando a combinação de dois modos de pré-processamentos (1ª derivada e autoescalonamento) como pode ser observado através do  $R^2$  de calibração, validação e predição. Assim, construiu-se o modelo com 7 variáveis latentes e com um RMSEC de 1,5%, RMSECV de 4,3%, RMSEP de 1,2% e esses resultados explicam 63,2% dos valores de X e 98,29% dos valores de Y.

Tabela 28: Resultados da calibração e da validação da formulação farmacêutica utilizando PLS.

	RMSEC	RMSECV	RMSEP	$R^2$ Calibração	$R^2$ Validação	$R^2$ Predição
	(%)	(%)	(%)			
1ª derivada	4,04	8,14	1,60	0,81726	0,39994	0,96015
Auto escalonamento	2,01	3,19	2,78	0,94364	0,85993	0,89804
Combinação de ambos	1,52	4,3	1,19	0,98281	0,86368	0,98057

Fonte: Do autor.

Na tabela 29 e figura 21 é possível ver que a combinação sequencial de ambos os métodos de pré-processamento permitem a quantificação da  $\beta$ -galactosidase

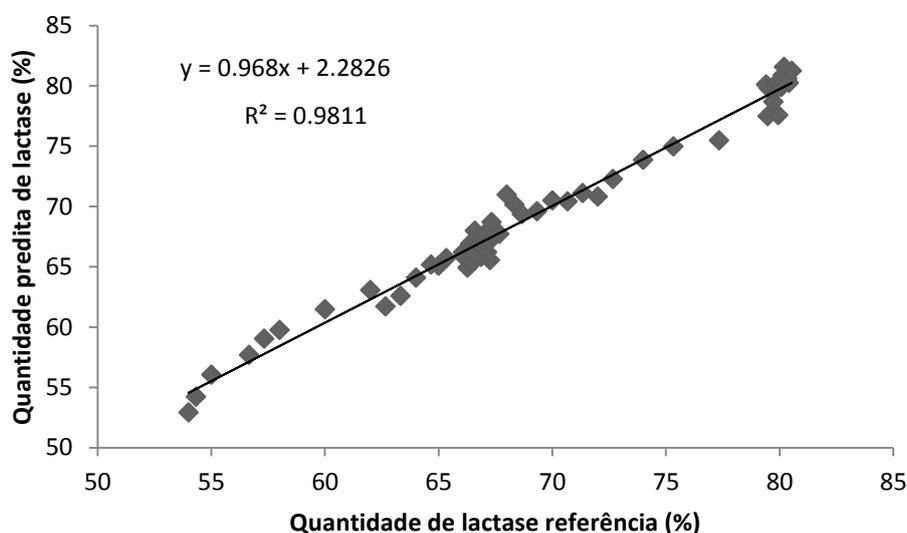
utilizando o método proposto. Esses resultados mostram que a análise utilizando PLS é capaz de quantificar a enzima em formulações farmacêuticas.

Tabela 29: Resultados obtidos da quantificação da  $\beta$ -galactosidase utilizando PLS.

	Equação	R <sup>2</sup>
1ª derivada	$y = 1,0065 x - 0,6864$	0,8173
Auto escalonamento	$y = 0,9431 x + 3,835$	0,9436
Combinação de ambos	$y = 0,968 x + 2,2826$	0,9811

Fonte: Do autor.

Figura 21: Gráfico de correlação entre os dados medidos x preditos.



Fonte: Do autor.

Para a validação, amostras independentes similares às amostras da calibração foram preparadas com 3 níveis diferentes de teor de lactase (correspondendo a 80, 100 e 120% de concentração de ativo). Três independentes lotes de cada formulação foram preparados e analisados em 3 diferentes dias, resultando em 9 lotes de comprimidos. A validação foi feita de acordo com o guia do ICH que inclui exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e linearidade.

A tabela 30 mostra o resultado da validação obtida com o método de MIR desenvolvido para lactase. A exatidão foi calculada através da recuperação, e a recuperação teve valores satisfatórios (próximo a 100%) nos três níveis de concentração. A precisão do método foi calculada através de dois parâmetros: repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (repetibilidade em diferentes

dias). Ambos os parâmetros estão dentro dos valores aceitáveis (máximo de 5 % de D.P.R.) em todos os níveis de concentração.

Tabela 30: Resultados da validação da formulação farmacêutica utilizando modelo PLS.

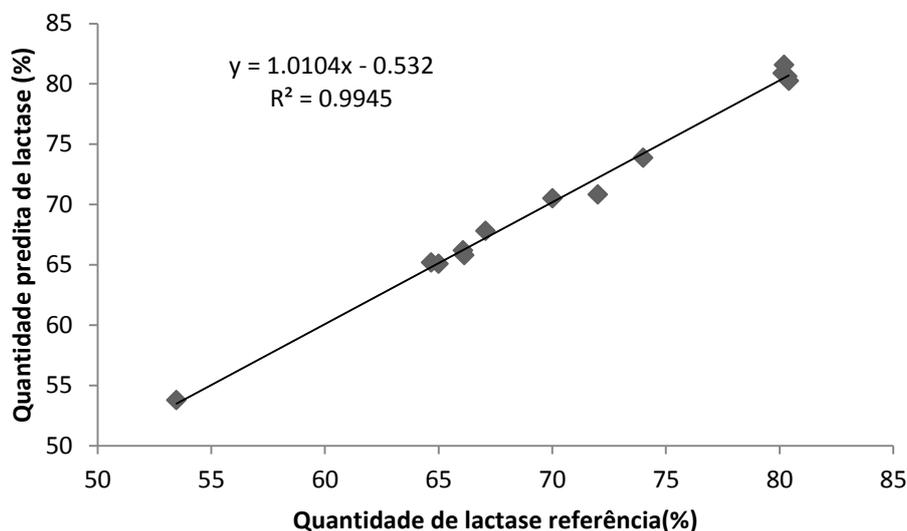
Nível de concentração (% $\beta$ -galactosidase)	Precisão		Exatidão
	Repetibilidade (DPR%)	Precisão intermediária (DPR%)	Recuperação (%)
80	0,70	0,58	98,46
100	0,89	0,60	101,89
120	1,36	0,56	98,46

Fonte: Do autor.

O melhor valor de repetibilidade foi obtido no nível mais baixo enquanto o melhor valor de precisão intermediária foi obtido no nível mais alto. Esses resultados podem ser explicados através da alta capacidade preditiva do modelo (RMSECV baixo e alto  $R^2$ ).

A figura 22 mostra o perfil de linearidade obtido do método quimiométrico de MIR para quantificação da enzima  $\beta$ -galactosidase.

Figura 22: Gráfico da validação dos dados preditos.



Fonte: Do autor.

Os valores preditos do teor de lactase nas amostras controles foram comparados com os valores obtidos pelo método de referência da USP (método utilizando reação

colorimétrica a partir do substrato de ONPG e quantificada através da espectroscopia UV-Vis) em termos de recuperação do teor do princípio ativo (Tabela 31).

Tabela 31: Resultados obtidos das amostras controles por MIR e pelo método de referência.

<b>Amostras controle</b>	<b>UV-Vis (%)</b>	<b>MIR (%)</b>	<b>Recuperação *(%)</b>
1	90.64	88.71	97.87
2	88.02	87.23	99.74
3	84.53	85.79	100.89
Média	88.02	87.23	99.74
DPR (%)	2.5	1.19	1.24

Fonte: Do autor.

Nota: (\*) Calculado como  $100 \times \text{MIR} / \text{UV-Vis}$ .

Ao analisar a tabela acima, conclui-se que o método desenvolvido utilizando a espectrofotometria na região do IV também pode ser utilizado como método alternativo de quantificação da enzima  $\beta$ -galactosidase, pois os valores de recuperação estão dentro da faixa esperada.

Suas desvantagens é que ele é um método que não quantifica a atividade enzimática, pois necessita de uma reação colorimétrica que apresenta sinal na região do visível, e não é capaz de visualizar uma possível desnaturação da enzima. Porém, dentre suas vantagens estão: o rápido preparo de amostra, uma técnica de baixo custo para quantificar o teor, fácil manuseio, não apresenta resíduos químicos e atende aos interesses industriais.

## 5 CONCLUSÃO

A lactase extraída é monomérica, com 105 kDa, estável em pH que varia de 4,0 a 9,0, e temperatura de 50 °C e é a enzima responsável pela catálise da hidrólise de polissacarídeos, dentre eles, da lactose. O uso clínico de tais biofármacos apresenta limitações, uma vez que a enzima em questão possui baixa estabilidade sob condições extremas, como pH muito ácidos ou básicos e alta temperatura pode levar à inativação enzimática.

Ao realizar o teste de estabilidade nota-se que a embalagem primária é fundamental na manutenção da atividade enzimática da lactase. Ao término do estudo de estabilidade, os comprimidos que estavam dentro da sua embalagem primária tiveram uma diminuição da sua atividade de aproximadamente 7,5%, enquanto os comprimidos que foram armazenados fora da sua embalagem original tiveram uma perda de aproximadamente 35,0%. Ao realizar o teste de dissolução também do produto comercial americano nota-se que a formulação existente não é capaz de proteger a enzima da ação degradante do ambiente gástrico do estômago, apresentando ao final do teste uma perda de 65,0% de atividade enzimática. Em comparação com a forma farmacêutica gastro-resistente (cápsulas de hipromelose), não houve perda de atividade durante a etapa ácida e ao final do ensaio de dissolução a atividade encontrada foi de 93,0%. Este ensaio de dissolução abre novas perspectivas sobre a questão da proteção enzimática em formulações, pois é de suma importância que a formulação garanta uma alta atividade enzimática no local de ação desejada. Quanto ao método de quantificação por infravermelho, observou-se que a homogeneidade da mistura entre biofármaco e excipientes influencia na construção do modelo ideal e ao processar os dados, utilizando pré-processamentos, constatou-se que o melhor modelo apresenta 7 VL, RMSECV de 4,3 %, RMSEP de 1,2%. Portanto, este método tem potencial para ser utilizado para a quantificação do teor de lactase, pois conforme recomendação da RE 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA, os métodos de dosagem devem ter um coeficiente de variação de no máximo 5%.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H. M. **Dissolution, bioavailability & bioequivalence**. Mack Pub Co, 1989. ISBN 0912734205.

AIACHE, J.; DEVISSAGUET, J.; GUYOT-HERMANN, A. **Galenica 2: Biopharmacie. Technique et Documentation**: Paris 1979.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$  galactosidase. **Food and Bioproducts processing**, v. 90, n. 2, p. 351-359, 2012. ISSN 0960-3085.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALEN JR, L. V. Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. In: (Ed.). Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos: Premier, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria., 1999. Disponível em: < [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/815ada0047458a7293e3d73fbc4c6735/RESOLUCAO\\_18\\_1999.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/815ada0047458a7293e3d73fbc4c6735/RESOLUCAO_18_1999.pdf?MOD=AJPERES) >. Acesso em: 12 de julho de 2015.

ANVISA. **Enzimas ativas: esclarecimentos para a avaliação de alimentos e suplementos**. 2015. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2015/enzimas+ativas+esclarecimentos+para+avaliacao+de+alimentos+e+suplementos> >. Acesso em: 10 de maio de 2015.

ATICI, E. B.; KARLIĞA, B. Quantitative determination of two polymorphic forms of imatinib mesylate in a drug substance and tablet formulation by X-ray powder diffraction, differential scanning calorimetry and attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 114, p. 330-340, 2015. ISSN 0731-7085.

BARAJAS, M. J. et al. Near-infrared spectroscopic method for real-time monitoring of pharmaceutical powders during voiding. **Applied spectroscopy**, v. 61, n. 5, p. 490-496, 2007.

BENDICHO, S. et al. Determination of proteolytic activity in different milk systems. **Food chemistry**, v. 79, n. 2, p. 245-249, 2002. ISSN 0308-8146.

BIOCHEMISTRY, N. C. O. T. I. U. O. Units of Enzyme Activity. **European Journal Biochemistry**, v. 97, p. 319-320, 1979.

BIOTECK. **Determination of  $\beta$  Galactosidase Activity using the PowerWave 200 Microplate Spectrophotometer**. 2001. Disponível em: <  
[http://www.biotek.com/resources/docs/PowerWave200\\_Determination\\_of\\_bGalactosidase\\_Activity.pdf](http://www.biotek.com/resources/docs/PowerWave200_Determination_of_bGalactosidase_Activity.pdf)>. Acesso em: 17 de março de 2015.

BLENDON, R. J. et al. Americans' views on the use and regulation of dietary supplements. **Archives of Internal Medicine**, v. 161, n. 6, p. 805-810, 2001. ISSN 0003-9926.

BRO, R.; SMILDE, A. K. Principal component analysis. **Analytical Methods**, v. 6, n. 9, p. 2812-2831, 2014.

BURNS, D. A. C., E. W. **Handbook of Near-Infrared Analysis**. New York: 2001.

CHALUS, P. et al. Near-infrared determination of active substance content in intact low-dosage tablets. **Talanta**, v. 66, n. 5, p. 1294-1302, 2005. ISSN 0039-9140.

DE CARVALHO ROCHA, W. F. et al. Quantitative analysis of piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 106, n. 2, p. 198-204, 2011. ISSN 0169-7439.

DE OLIVEIRA FERREIRA, A.; BRANDÃO, M. **Guia prático da farmácia magistral**. Pharmabooks, 2008. ISBN 8589731197.

DIEKMANN, L.; PFEIFFER, K.; NAIM, H. Y. Congenital lactose intolerance is triggered by severe mutations on both alleles of the lactase gene. **BMC gastroenterology**, v. 15, n. 1, p. 36, 2015. ISSN 1471-230X.

EL-HAGRASY, A. S. et al. Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 9, p. 1298-1307, 2001. ISSN 1520-6017.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Brasília, 2010. 66-73.

FERREIRA, M. C., ANTUNES, A. M., MELGO, M. S., VOLPE, P. L. O.  
Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724-731, 1999. ISSN 1678-7064.

FERREIRA, M. H.; BRAGA, J. W.; SENA, M. M. Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 158-164, 2013. ISSN 0026-265X.

FERREIRA, M. H.; GOMES, J. F.; SENA, M. M. Development and validation of a multivariate calibration model for determination of dipyrone in oral solutions by near infrared spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 9, p. 1680-1686, 2009. ISSN 0103-5053.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. Dietary Supplement. 2008.  
Disponível em: <  
<http://www.fda.gov/downloads/ForConsumers/ConsumerUpdates/UCM050824.pdf>>.  
Acesso em: 23 de agosto de 2015.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION-ICH **Stability testing of new drug substances and products**. Q1A (R2), Current Step, v. 4, 2003.

ICH. **Stability testing of biotechnological/biological products**. International Conference on Harmonization, ICH Harmonized Triparties Guideline, 1995.

HANSEN, P. W. Pre-processing method minimizing the need for reference analyses. **Journal of chemometrics**, v. 15, n. 2, p. 123-131, 2001. ISSN 0886-9383.

HUYGHEBAERT, N.; VERMEIRE, A.; REMON, J. P. Alternative method for enteric coating of HPMC capsules resulting in ready-to-use enteric-coated capsules. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 21, n. 5, p. 617-623, 2004. ISSN 0928-0987.

JAMRÓGIEWICZ, M. Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 66, p. 1-10, 2012. ISSN 0731-7085.

KERPEL-FRONIUS, E.; JANI, L.; FEKETE, M. Disaccharide malabsorption in different types of malnutrition. *Annales paediatrici*. International review of pediatrics, 1966. p.245.

KULKARNI, S. R. et al. **Preparing enzyme tablets for the treatment of lactose defects**: Google Patents 2000.

LACTAID. 2015. Disponível em: < <https://www.lactaid.com/products/original-strength> > Acesso em: 11 de janeiro de 2015.

LÊ, L. M. M. et al. Non-invasive quantification of 5 fluorouracil and gemcitabine in aqueous matrix by direct measurement through glass vials using near-infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 119, p. 361-366, 2014. ISSN 0039-9140.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Braz. J. Pharm. Sci**, v. 41, n. 2, 2005.

LUYPAERT, J.; MASSART, D.; VANDER HEYDEN, Y. Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 865-883, 2007. ISSN 0039-9140.

MAKSIMAINEN, M. M. et al. The crystal structure of acidic beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Int J Biol Macromol**, v. 60, p. 109-15, 2013. ISSN 1879-0003 (Electronic) 0141-8130 (Linking).

MANTSCH, H. H.; CHAPMAN, D. **Infrared spectroscopy of biomolecules**. Wiley-Liss, 1996. ISBN 0471021849.

MARTÍNEZ, L. et al. Use of near-infrared spectroscopy to quantify drug content on a continuous blending process: Influence of mass flow and rotation speed variations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 3, p. 606-615, 2013. ISSN 0939-6411.

MARZORATI, M. et al. A novel hypromellose capsule, with acid resistance properties, permits the targeted delivery of acid-sensitive products to the intestine. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 544-551, 2015. ISSN 0023-6438.

MATTAR, R. et al. Frequency of LCT-13910C> T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. **Nutr J**, v. 8, n. 46, p. 10.1186, 2009.

MATTHEWS, S. B. et al. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. **Postgraduate medical journal**, v. 81, n. 953, p. 167-173, 2005. ISSN 1469-0756.

MAZUREK, S.; SZOSTAK, R. Quantitative analysis of thiamine hydrochloride in tablets—comparison of infrared attenuated total reflection, diffuse reflectance infrared and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 62, p. 10-16, 2012. ISSN 0924-2031.

MILLER, J. H. A short course in bacterial genetics. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 61, p. 73-75, 1992.

MONTEIRO, M. F. D., J.S.P.; TREVISAN, M.G.; GARCIA, J.S. Stability testing of  $\beta$ -galactosidase. 2015.

NICHELE, V.; SIGNORETTO, M.; GHEDINI, E.  $\beta$ -Galactosidase entrapment in silica gel matrices for a more effective treatment of lactose intolerance. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, n. 1, p. 10-15, 2011. ISSN 1381-1177.

OHTAKE, S.; KITA, Y.; ARAKAWA, T. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 13, p. 1053-1073, 2011. ISSN 0169-409X.

OTTO, M. **Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry**. New York Wiley-VCH, 1999. ISBN 352729628X.

PAN, D. et al. Low level drug product API form analysis—Avalide tablet NIR quantitative method development and robustness challenges. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 89, p. 268-275, 2014. ISSN 0731-7085.

PAVIA, D. L. et al. Introdução à espectroscopia. **Cengage Learning**, v. 4, 2010.

PEREIRA FILHO, D.; FURLAN, S. Prevalência de intolerância à lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do Laboratório Dona Francisca, Joinville (SC). **Rev Saúde e Ambiente**, v. 5, n. 1, p. 24-30, 2004.

PERKIN ELMER. **FT-IR Spectroscopy- Attenuated Total Reflectance (ATR)**. 2015. Disponível em: < <http://www.perkinelmer.com/> >. Acesso em: 11 de janeiro de 2015.

PIANTAVINI, M. S. et al. Chemometric quality inspection control of pyrantel pamoate, febantel and praziquantel in veterinary tablets by mid infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 125, p. 396-403, 2014. ISSN 1386-1425.

PRISTA, L.; ALVES, A.; MORGADO, R. Tecnologia farmacêutica e Farmácia Galénica, 8ª edição. **Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian**, 2011.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 8, p. 1109-1143, 2005. ISSN 0169-409X.

REMYINGTON, J. P.; TROY, D. B.; BERINGER, P. **Remington: The science and practice of pharmacy**. Lippincott Williams & Wilkins, 2006. ISBN 0781746736.

ROCHA, W. F. et al. Determination and validation of nimesulide in pharmaceutical formulation by near infrared spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p. 1929-2010, 2010. ISSN 0103-5053.

ROGGO, Y. et al. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 44, n. 3, p. 683-700, 2007. ISSN 0731-7085.

ROWE, R. C. et al. **Handbook of pharmaceutical excipients**. Pharmaceutical press London, 2009.

SARRAGUÇA, M. C.; SOARES, S. O.; LOPES, J. A. A near-infrared spectroscopy method to determine aminoglycosides in pharmaceutical formulations. **Vibrational Spectroscopy**, v. 56, n. 2, p. 184-192, 2011. ISSN 0924-2031.

SENA, M. M.; TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados Multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma Humano por espectrofluorimetria. **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 910-920, 2005.

SILVA, F. E. et al. Simultaneous determination of sulphamethoxazole and trimethoprim in powder mixtures by attenuated total reflection-Fourier transform infrared and multivariate calibration. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 49, n. 3, p. 800-805, 2009. ISSN 0731-7085.

SILVA, M. A. et al. Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 89, p. 342-351, 2012. ISSN 0039-9140.

SILVERSTEIN, R. M. B., G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: 2007.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M. **Principles of instrumental analysis**. Saunders College Philadelphia, 2009.

SMITH, B. C. **Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy**. CRC press, 2011. ISBN 1420069306.

TOMAR, B. S. Lactose intolerance and other disaccharidase deficiency. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 81, n. 9, p. 876-880, 2014. ISSN 0019-5456.

UNITED STATES PHARMACOPEIA - USP. **The United States Pharmacopeia Convention**. Rockville, 2005. Part 2, p. 745-823.

USTOK, F. I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of  $\beta$ -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1114-1120, 2010. ISSN 0308-8146.

WISE, B. et al. Chemometrics tutorial for PLS\_Toolbox and Solo. **Eigenvector Research, Inc**, v. 3905, 2006.

ZANG, H. et al. Application of near-infrared spectroscopy combined with multivariate analysis in monitoring of crude heparin purification process. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 109, p. 8-13, 2013. ISSN 1386-1425.

ZHENG, Y. et al. Determination of moisture content of lyophilized allergen vaccines by NIR spectroscopy. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 46, n. 3, p. 592-596, 2008. ISSN 0731-7085.