



PRPG Pró-Reitoria de Pós-Graduação
PIBIC/CNPq/UFCA-2009

ESTUDO DA DISSOLUÇÃO *IN VITRO* DE EXTRATOS FITOTERÁPICOS

Francisco Assis Nogueira Júnior¹; Julyanna Damasceno Pessoa¹; Shirley Waleska C. Araújo²; Osvaldo S. da Silva³; Odelsia L. Sánchez de Alsina³

¹Aluno do curso de Engenharia Química, bolsista PIBIC

²Mestrado em Engenharia Química, bolsista CAPES

³UAEQ, orientadores

RESUMO

A quebra-pedra (*Phyllanthus Niruni L.*) é uma espécie vegetal largamente utilizada pela medicina tradicional com comprovadas atividades farmacológicas. Em seu extrato encontram-se compostos químicos como alcalóides e esteróides, compostos fenólicos, como taninos e flavonóides, entre outros. Neste trabalho estudou-se a dissolução *in vitro* de taninos a partir de grânulos do extrato de quebra-pedra que foram recobertos em leito de jorro convencional com um filme polimérico gastro-resistente à base de Eudragit[®]. O revestimento gastro-resistente é uma técnica usada na preparação de formas farmacêuticas para que resistam, sem alteração, à ação do suco gástrico, devendo, porém, desagregar-se rapidamente no suco intestinal. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito das variáveis do processo de recobrimento dos grânulos, vazão da suspensão de recobrimento e temperatura do ar de secagem, sobre a eficiência da dissolução. Os ensaios de dissolução *in vitro* foram realizados em duas etapas: ácida e alcalina, representando os meios gástrico e entérico, respectivamente. Em todas as condições estudadas observou-se uma gastro-resistência parcial do filme de revestimento dos grânulos de Quebra-pedra, já que houve liberação de fenóis durante a etapa ácida. Foram também identificadas quais as condições operacionais mais adequadas a fim de proporcionar uma liberação gastro-resistente dos taninos presentes.

Palavras-chave: dissolução *in vitro*, revestimento gastro-resistente, fenóis totais

ABSTRACT

The break-stone (*Phyllanthus Niruni L.*) is an herb widely used by traditional medicine with established pharmacological activity. The active principles in the extract are chemical compounds like steroids, alkaloids and phenolic compounds, such as tannins and flavonoids, among others. In this work the *in vitro* dissolution of tannins from granules of break-stone, coated in a conventional spouted bed by a film of gastro resistant polymer, Eudragit[®] base was studied. Gastro-resistant coating is a technique used in the preparation of pharmaceutical forms in order to resist gastric juice action, but quickly disintegrate and absorb in intestinal juice. The primary goal of this work was to assess the effect of process variables: polymer suspension flow rate and air temperature, on the efficiency of the dissolution. The *in vitro* dissolution tests were conducted in two stages: acidic and alkaline, representing gastric and enteric media respectively. In all the studied conditions a partial gastro-resistance of the coating film was observed because some phenols were dissolved during the acid stage. The best operating conditions for the process of coating in spouted bed were identified in order to obtain gastro-resistant liberation of the pharmaceutical active components in the granules.

Keywords: *in vitro* dissolution, gastro-resistant coating, total phenols.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento da terapêutica com uso de plantas medicinais, considerando que possui uma flora muito rica e diversificada (Meira, 2007). A quebra-pedra é uma espécie vegetal largamente utilizada pela medicina tradicional com comprovadas atividades

farmacológicas. A principal indicação terapêutica é contra litíase renal, sendo os polifenóis presentes na sua constituição química, os possíveis responsáveis por essa atividade (Souza et al., 2005).

O recobrimento polimérico do extrato fitoterápico seco pode melhorar o aspecto visual do produto, agregando valores comerciais e protegendo-o de condições ambientais desfavoráveis (Coral, 2004). Outra reconhecida vantagem do recobrimento é a possibilidade de liberação controlada do princípio ativo, facilitando a absorção entérica e protegendo a mucosa do trato digestivo.

Dentre os vários tipos de processos existentes atualmente para se realizar operações de revestimento em partículas, o processo no leito de jorro tem se demonstrado promissor devido à facilidade de operação, controle e qualidade do produto obtido. Esse processo tem sido amplamente empregado para a aplicação de revestimento em produtos químicos, agrícolas e farmacêuticos, tais como sementes de brócolos (Almeida e Rocha, 2008), uréia (Donida, 2000), comprimidos e uréia (Ayub, 1997), entre outros. Em particular, tem sido atribuída a esse processo a vantagem de formação de camada altamente uniforme em curto tempo de processamento, devido, principalmente, às excelentes condições de transferência de calor e de massa no interior do equipamento (Martins e Oliveira, 2003).

A funcionalidade da operação de recobrimento na indústria farmacêutica está geralmente associada ao perfil de liberação do composto ativo do medicamento. Portanto, é indispensável que estudos que tratam de desenvolvimento de produtos recobertos e processos de recobrimento venham acompanhados de avaliações do perfil de dissolução do fármaco. Os estudos de dissolução dos princípios ativos são importantes do ponto de vista fisiológico no sentido de proteger o trato gastrointestinal em relação à administração do medicamento (Nitz, 2006).

O revestimento gastro-resistente é uma técnica usada na preparação de formas farmacêuticas para que resistam, sem alteração, à ação do suco gástrico, devendo, porém, desagregar-se rapidamente no suco intestinal (Lachman et al., 2001).

Segundo Souza et al. (2007), os estudos de dissolução representam uma ferramenta indispensável para as várias etapas dos processos de desenvolvimento farmacotécnico de medicamentos, permitindo verificar a estabilidade dessas formulações. Na área de produção farmacêutica e controle de qualidade, os resultados do teste de dissolução podem ser empregados para detectar desvios de fabricação, para assegurar uniformidade durante a produção de um lote e reprodutibilidade lote a lote.

Os experimentos de dissolução são essenciais, pois medem a porcentagem de fármaco dissolvido no meio de dissolução, seja este água ou sucos gástrico e intestinal simulados. O teste consiste na utilização de aparelho que simula as condições do TGI (trato gastrointestinal) em termos de temperatura e agitação para medir a quantidade de fármaco dissolvido no meio em determinado espaço de tempo. Estes experimentos podem medir a taxa de dissolução, coletando-se amostras em tempos variados, ou simplesmente medir a porcentagem em determinado tempo por medição única (Lira, 2004).

Alguns fatores que influenciam diretamente nos ensaios de dissolução são: volume, temperatura e pH do meio de dissolução; presença de gases dissolvidos; tensão superficial, evaporação do meio; vibração externa; calibração do equipamento; solubilidade e dimensão das partículas; constituintes da forma farmacêutica; ensaio de dissolução adotado, entre outros.

A Farmacopéia Americana (USP, 2005) descreve alguns métodos para ensaios de dissolução de comprimidos com revestimento gastro-resistente. Um desses métodos consiste em testar o produto em uma solução de HCl 0,1 N por 2 horas, denominada etapa ácida, e depois alterar o pH para 6,8 pela adição do tampão com fosfato de sódio tribásico 0,2 M, ajustando, se necessário, o pH com NaOH 2N ou HCl (etapa básica). A etapa básica com tampão é realizada por 45 minutos

O objetivo geral deste trabalho é estudar o efeito das variáveis do processo de recobrimento dos grânulos do extrato de quebra-pedra em leito de jorro, vazão da suspensão de recobrimento e temperatura do ar de secagem, verificando quais as condições operacionais do recobrimento mais adequadas a fim de proporcionar uma liberação gastro-resistente dos fenóis totais presentes nos grânulos.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Transferência em Meios Porosos e Sistemas Particulados no Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande – PB (LTMPSP/UFCG).

Materiais

Grânulos do Extrato de Quebra-pedra

Nos ensaios de dissolução *in vitro* foram utilizados grânulos do extrato de quebra-pedra recobertos em leito de jorro convencional, por Rocha (2006), com um filme polimérico gastro-resistente à base de Eudragit®. A faixa de diâmetro dos grânulos era de 1,77 a 3,35 mm. Os grânulos permaneceram armazenados, antes dos testes de dissolução, por aproximadamente dois anos em recipientes plásticos

fechados, contudo, sem proteção da luz natural. Na Figura 1 pode ser visto a imagem de um grânulo sem e com recobrimento.

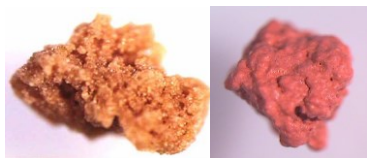


Figura 1 – Grânulos do extrato de quebra-pedra sem e com recobrimento, respectivamente.

É importante ressaltar que a irregularidade dos grânulos deve-se ao método utilizado para a granulação do extrato em pó de quebra-pedra.

Câmara Incubadora (Shaker)

Nos ensaios de dissolução *in vitro* foi utilizado um Shaker do tipo MA-420, como forma alternativa e adaptada de um dissolutor convencional. Este equipamento é aplicável em testes que necessitam de agitação orbital constante e temperatura controlada com variação mínima, possibilitando variações ambientais diversas, especialmente em laboratórios de biologia, microbiologia, biotecnologia, fermentação e desenvolvimento de fungos, aquecimento de plantas *in vitro* e outros.

Métodos

Ensaio de Dissolução *in vitro*

Os ensaios de dissolução *in vitro* foram realizados partindo-se de um planejamento fatorial de $2^2 + 2$ repetições no ponto central, tendo como variáveis independentes a temperatura do ar de secagem e a vazão da suspensão de recobrimento, que foram as variáveis utilizadas por Rocha (2006) para recobrir os grânulos. As vazões e temperaturas estudadas foram, respectivamente, 6; 9; 12 g/min e 50; 60; 70°C. A eficiência da dissolução foi a variável dependente analisada.

Os testes de dissolução *in vitro* basearam-se no método descrito pela Farmacopéia Americana (USP-2005) para avaliação de formas farmacêuticas de liberação gastro - resistentes. Os perfis de liberação foram obtidos no shaker descrito acima, com uma rotação de 100 rpm. A temperatura do equipamento foi mantida a 37°C com variação de $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Procedimento experimental: Inicialmente pesava-se 0,5g de grânulos recobertos e colocava-os em um erlenmeyer. O mesmo era levado ao shaker, com a temperatura de 37°C já estabelecida, onde se adicionava 75 mL de HCl 0,1M, dando início imediatamente ao ensaio de dissolução. Os grânulos permaneciam no meio ácido durante 120 min, simulando o meio gástrico. Durante esta etapa eram retiradas alíquotas nos intervalos de 30, 60 e 120 min, para a posterior quantificação do princípio ativo (fenóis totais). Após esse tempo eram adicionados ao meio de dissolução 25 mL de fosfato de sódio tribásico 0,2 M, simulando desta forma o meio entérico. Nesta etapa retiravam-se alíquotas em 125, 130, 140 e 165 min. A eficiência da dissolução, η_d , foi calculada através da Equação (1), que representa a massa de fenóis dissolvida, m_d , em relação à massa total de fenóis, m_t , presente nos grânulos:

$$\eta_d = \frac{m_d}{m_t} \cdot 100 \quad (1)$$

Determinação dos Fenóis Totais (Taninos).

A princípio foi construída uma curva de calibração (Figura 2) da seguinte forma: utilizou-se ácido tânico, padrão analítico, diluído numa solução de HCl (0,1M) e fosfato de sódio tribásico (0,2M), cujo pH desta solução era aproximadamente 7,0. As concentrações utilizadas foram de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para o primeiro ponto da curva retirou-se 0,25 mL da solução padrão de ácido tânico, adicionou-se 2 mL do reagente de Folin-Denis e 4mL de Na_2CO_3 , completando o volume para 8 mL com a solução neutra (HCl + fosfato). Em seguida, esperou-se o tempo de reação de 2h. Logo após, retirou-se 2mL dessa solução e fez-se uma diluição para 25mL com uso da solução neutra. Os demais pontos foram obtidos da mesma forma, de modo a atingir as concentrações de ácido tânico desejadas. A absorvância foi lida a 725 nm num espectrofotômetro UV – visível. Uma amostra em branco foi utilizada a cada leitura. Os fenóis totais dissolvidos durante os ensaios de dissolução foram quantificados de maneira semelhante ao procedimento descrito para a curva de calibração, porém, eram retirados 2mL das amostras obtidas a cada intervalo.

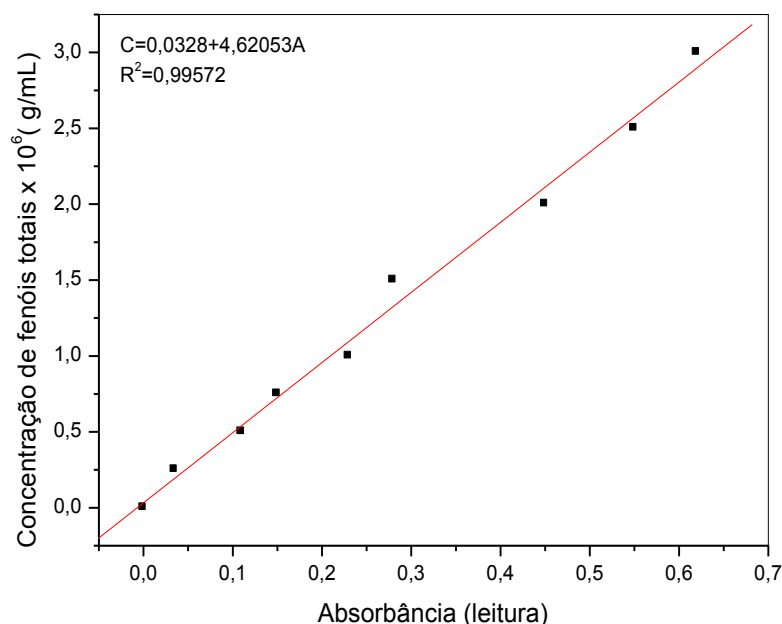


Figura 2- Curva de calibração para fenóis totais (Taninos)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os valores da eficiência da dissolução, η_d , e os correspondentes valores de crescimento dos grânulos em relação ao filme de revestimento, para cada condição estudada nos ensaios de dissolução.

Tabela 1 – Relação entre crescimento da partícula e eficiência da dissolução.

T (°C)	W (g/min)	\bar{d} (%)	η_d (%)
70	6	13,08	62,00
70	12	11,73	84,96
50	12	12,78	72,96
50	6	15,86	91,73
60	9	10,06	47,8
60	9	9,74	58,2

Observa-se, através da Tabela 1, que o aumento da vazão de 6 para 12 g/min, fixando 70°C, contribuiu para aumentar a dissolução dos taninos, uma vez que o grânulo apresentava menor crescimento. Este comportamento não foi observado para a temperatura de 50°C, onde o aumento da vazão proporcionou diminuição da eficiência da dissolução, mesmo com o grânulo apresentado menor crescimento. Em relação ao efeito da temperatura, verifica-se que para a vazão fixa de 12 g/min, aumentou também a eficiência da dissolução, o que mais uma vez está relacionado ao menor crescimento dos grânulos. No entanto, este comportamento não foi visto para a vazão de 6/min. A partir dos dados obtidos não é possível avaliar com precisão o efeito da temperatura e da vazão sobre a dissolução dos fenóis totais (taninos), contudo, em alguns experimentos foi visto a clareza da relação linear entre crescimento do grânulo e eficiência da dissolução. O ponto central (9 g/min e 60°C) apresentou menores eficiências de dissolução, apesar de terem menor camada de filme (menor crescimento).

Perfis de Dissolução

A Figura 3 mostra o perfil de dissolução dos fenóis totais para os grânulos sem recobrimento, representando a porcentagem de fenóis liberados em função do tempo de dissolução. Observa-se que há uma dissolução de fenóis já nos primeiros instantes.

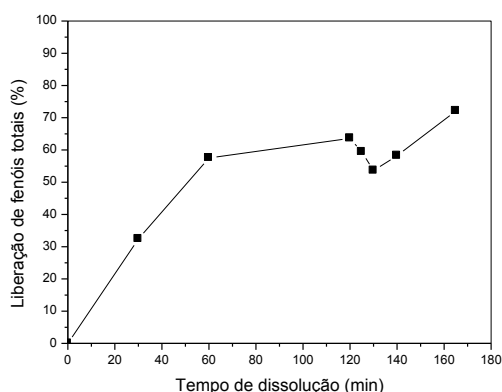


Figura 3 – Perfil de dissolução dos Taninos para os grânulos não recobertos.

As Figuras 4; 5; 6 e 7 representam os perfis de dissolução dos fenóis totais a partir dos grânulos recobertos nas diversas condições de temperatura e vazão estudadas. Comparando o perfil de dissolução da Figura 3 com os perfis das Figuras 4 a 7, verifica-se que o filme de revestimento dos grânulos apresentou uma gastro - resistência parcial em relação aos fenóis totais, já que houve liberação de fenóis a partir dos primeiros instantes de dissolução, ou seja, na etapa ácida, porém em quantidade bem menor para os grânulos com revestimento polimérico, salvo no experimento representado na Figura 7, obtida com grânulos recobertos nas condições de menor vazão de suspensão e menor temperatura.

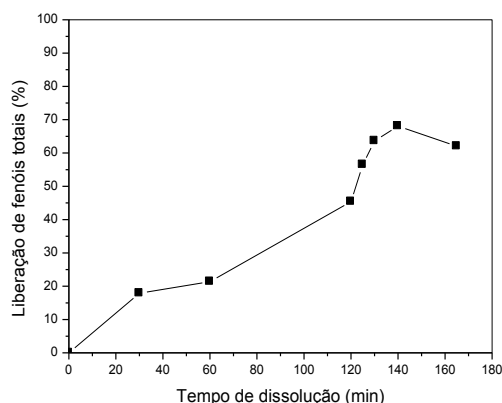


Figura 4 - Perfil de dissolução dos Taninos para os grânulos recobertos. (W = 6g/min ; T = 70°C)

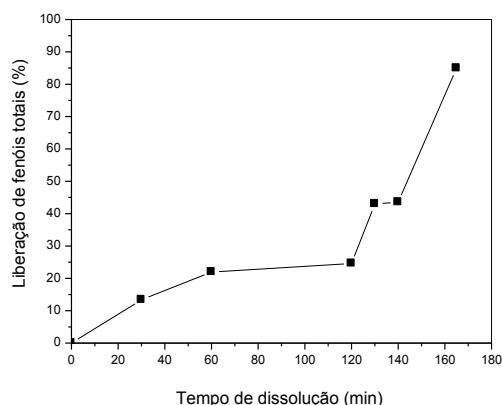


Figura 5 - Perfil de dissolução dos taninos para os grânulos recobertos. (W = 12g/min; T = 70°C).

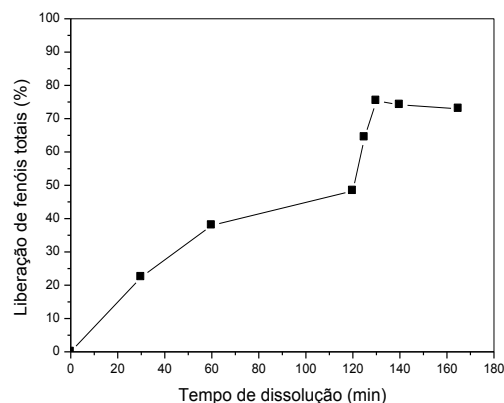


Figura 6 - Perfil de dissolução dos taninos para os grânulos recobertos. (W = 12g/min; T = 50°C).

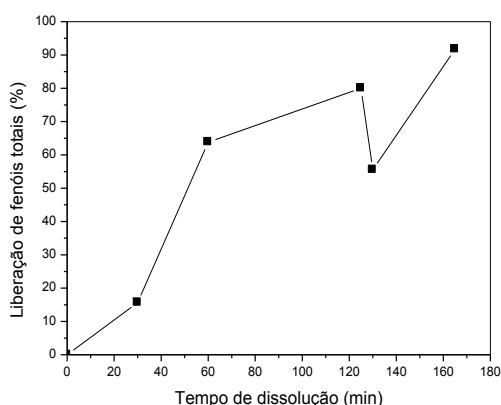


Figura 7 - Perfil de dissolução dos taninos para os grânulos recobertos. (W = 6g/min; T = 50°C).

Pelos perfis de dissolução apresentados nas Figuras 3 a 8 observa-se que a gastro-resistência do filme, representada pela dissolução na etapa ácida, nos primeiros 120min do ensaio, foi parcial. Além do desgaste do filme, devido o tempo de armazenamento dos grânulos, outros fatores podem ter contribuído para os princípios ativos se difundirem no meio ácido, como:

- A presença de falhas e fissuras na superfície das partículas, que constituiriam caminhos para a difusão e transferência dos princípios ativos do interior da partícula para o meio ácido;
- partículas de extrato seco, produzidas pelo atrito no leito de jorro durante o recobrimento, poderiam ter sido aderidas ao filme na etapa de secagem da suspensão polimérica.

Araújo (2009) trabalhou com os mesmos grânulos de quebra-pedra recobertos em leito de jorro, e, além dos fenóis totais estudou também a dissolução de flavonóides nas mesmas condições estudadas no presente trabalho. No entanto, verificou gastro-resistência total do filme em relação aos flavonóides, já que só houve liberação dos mesmos na etapa alcalina, ou então só foram detectados nesta fase. Esta diferença pode está relacionada ao fato de que os fenóis totais estão presentes em quantidade bem maior do que os flavonóides no extrato de quebra-pedra, e com isso tenham sido quantificados com maior facilidade em meio ácido.

A Figura 8 mostra o perfil de dissolução no ponto central, ou seja, nas condições de 9 g/min e T = 60°C, onde se observa que não houve boa reprodutibilidade dos valores, porém o comportamento da cinética de dissolução apresentou tendências semelhantes. As diferenças observadas na cinética de liberação podem ser atribuídas às amostras utilizadas para cada intervalo de tempo, pois, apesar de apresentarem a mesma massa, possuíam grânulos de tamanhos variados e de formas irregulares. O tempo de armazenamento também pode ter influenciado, desgastando o filme de certas partículas mais do que de outras. Os erros experimentais envolvidos podem estar associados diretamente à sensibilidade do método analítico utilizado para determinar os fenóis totais, inclusive ao próprio ensaio de dissolução adotado.

Analisando o efeito das condições operacionais durante o recobrimento observa-se que o ensaio realizado com grânulos recobertos com a menor vazão de suspensão de 6g/min e menor temperatura, 50°C, foi o de pior resultado em termos de gastro-resistência, apresentando praticamente o mesmo nível de dissolução, em torno de 65%, que os grânulos sem recobrimento cõ se verifica comparando as Figuras 3 e

7. A baixa proteção em meio ácido apresentada neste ensaio, apesar de ter um elevado crescimento de 15,86% (ver Tabela 1) pode ser explicada por uma baixa qualidade do filme, com fissuras e poros, obtida nessas condições de trabalho. Por outro lado, os grânulos recobertos com a maior vazão e temperatura, 12 g/min e 70°C, apesar de crescimento intermediário de 11,70% (Figura 5 e Tabela 1) são os que tiveram a melhor gastro-resistência, com apenas 25% de dissolução na etapa ácida, indicando boa qualidade do filme. Entretanto, a eficiência de dissolução, representando principalmente o comportamento na fase entérica, parece ter uma correlação direta com a espessura do filme, quando se compara experimentos realizados à mesma temperatura. Como se observa na tabela 1, os maiores valores de eficiência de dissolução foram obtidos nas condições extremas: com a menor vazão e temperatura (6g/min e 50°C, 91,73%) e com a maior vazão e temperatura (12g/min e 70°C; 84,86%). Considerando os efeitos combinados de gastro-resistência e eficiência de dissolução, as melhores condições de recobrimento em leite de jorro foram vazão de 12g/min e temperatura de 70°C, no intervalo estudado no presente trabalho.

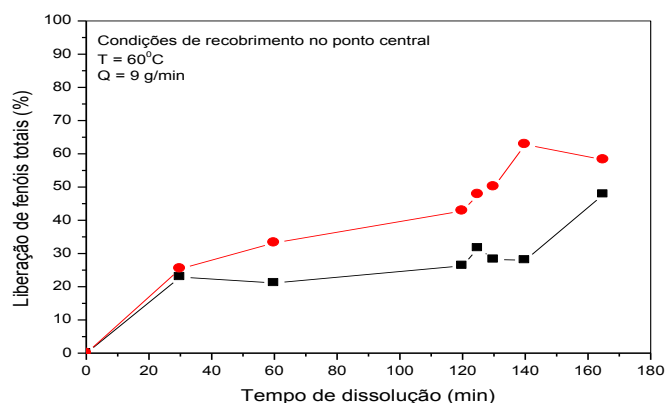


Figura 8 – Reprodutibilidade do perfil de dissolução dos taninos (W = 9 g/min; T = 60°C).

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que:

- Os efeitos combinados da temperatura e da vazão sobre a dissolução dos fenóis totais, não apresentaram significância estatística. Contudo, foi observada correlação entre crescimento do grânulo e eficiência da dissolução, especialmente para experimentos realizados à mesma temperatura.
- O filme de revestimento dos grânulos apresentou gastro - resistência parcial em relação aos fenóis totais (taninos), fato este que pode estar diretamente ligado à qualidade do filme relativa tanto às condições de recobrimento como ao envelhecimento do filme devido o tempo de armazenamento dos grânulos recobertos.
- Considerando os efeitos combinados de gastro-resistência e eficiência de dissolução, as melhores condições de recobrimento em leite de jorro, no intervalo estudado no presente trabalho, foram: vazão de 12g/min e temperatura de 70°C obtendo-se uma dissolução parcial de apenas 25% na fase gástrica e eficiência de dissolução total, incluindo a fase entérica, de 84,86%

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C.; ROCHA, S. C. S. Eficiência do processo de recobrimento de sementes de brócolos recobertas com polímero em leite de jorro. Engenharia Agrícola, vol. 28, n.2, Jaboticabal , 2008.
- ARAÚJO, S. W. C. Estudo da dissolução *in vitro* de grânulos do extrato de quebra-pedra (*Phyllanthus Niruni* L.) recobertos em leite de jorro. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande – PB, 2009.
- AYUB, G. S. E. Recobrimento de uréia com enxofre fundido em leite de jorro. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

- CORAL, C.T. Comunicação Pessoal. Gerente de tecnologia da GALENA – Química e Farmacêutica, Campinas, SP, 2004.
- DONIDA, M. W. Recobrimento polimérico da uréia em leito de jorro bidimensional. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, 2000.
- LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.; KANIG, J.L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, vol.II, 2001.
- LIRA, L. M. Avaliação de sistemas nanoparticulados baseados em bentonita sódica purificada como incrementadores de dissolução em comprimidos preparados por granulação úmida e compressão direta. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, RJ, 2004.
- MARTINS, G. Z.; OLIVEIRA, W. P. Utilização do leito de jorro para a aplicação de revestimento entérico em cápsulas gelatinosas duras. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 39, n. 3, 2003.
- MEIRA, M. Projeto Pedagógico do Curso de Pós-graduação em Fitoterapia (*lato sensu*). Faculdade Isaac Newton, Salvador, Ba, 2007.
- NITZ, M. Fluidodinâmica, secagem e recobrimento em leito pulso-fluidizado. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.
- ROCHA, A. T. P. Estudo do processo de recobrimento contínuo de extratos fitoterápicos secos em leito de jorro. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande, PB, 2006.
- SOUZA, T. P.; SPANIOL, B.; PETROVICK, P. R. Avaliação de Comprimidos Revestidos por Película contendo Alta Concentração de Produto Seco por Aspersão de *Phyllanthus niruri*. *Acta Farm. Bonaerense* 24 (1): 61-7 (2005).
- SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol.43, n. 4, São Paulo, 2007.
- UNITED States pharmacopoeia (USP), 28. ed. Rockville: The United States Convention, 3187 p, 2005.