

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Rosana Pereira da Silva

**Pré- formulação, reologia e dissolução de *Lithothamnium*
calcareum utilizado como suplemento de cálcio**

São Paulo
2021

Prof. Dr. Vahan Agopyan
Reitor da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz
Diretor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço
Chefe do Departamento de Farmácia

Prof. Dr. André Rolim Baby
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Rosana Pereira da Silva

Pré- formulação, reologia e dissolução de *Lithothamnium calcareum* utilizado como suplemento de cálcio

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de MESTRE em Ciências

Área de concentração: Fármaco e Medicamentos

Orientador: Prof.^o Dr.^o Humberto Gomes Ferraz

São Paulo

2021

Rosana Pereira da Silva

**Pré- formulação, reologia e dissolução de *Lithothamnium
calcareum* utilizado como suplemento de cálcio**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de MESTRE em Ciências

Área de concentração: Fármaco e Medicamentos

Orientador: Prof.^o Dr.^o Humberto Gomes Ferraz

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S586p Silva, Rosana Pereira da
Pré- formulação, reologia e dissolução de
Lithothamnium calcareum utilizado como suplemento
de cálcio / Rosana Pereira da Silva. - São Paulo,
2021.
167 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia - Programa de Pós-Graduação
em Fármaco e Medicamentos.
Orientador: Ferraz, Humberto Gomes

1. Algas marinhas. 2. Cálcio. 3. Comprimidos. 4.
Suplementos dietéticos. 5. Osteoporose. I. T. II.
Ferraz, Humberto Gomes, orientador.

Rosana Pereira da Silva

Pré- formulação, reologia e dissolução de *Lithothamnium calcareum* utilizado como suplemento de cálcio

Comissão Julgadora da Dissertação para a obtenção do Título de Mestre

Prof^o. Dr^o. Humberto Gomes Ferraz
Orientador/Presidente

1^o Examinador

2^o Examinador

3^o Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2021.

*Dedico este trabalho à minha família,
e aos sobrinhos
Raphaelly, Matheus, Bruna e Lorenzo.*

AGRADECIMENTOS

Não foi nada fácil chegar até aqui! A jornada foi longa e desafiadora e por essa conquista eu quero agradecer à todos que acreditaram em mim, no meu potencial! Todo o conhecimento que eu adquiri me tornou uma pessoa melhor profissionalmente e pessoalmente.

Obrigada professor Dr. Humberto Gomes Ferraz por me abrir as portas do DEINFAR e me dar a oportunidade de conhecer o mundo da farmacotécnica. Obrigada por todo apoio e incentivo! Sou grata por tudo!

À todos os colaboradores presentes, aos que passaram pelo laboratório e contribuíram com este trabalho (foram muitos...não dá para citar todos!). Não mediram esforços e também eu aprendi muito com vocês!

Ao Allef Fante, muito obrigada por toda ajuda, pelas figuras...te dei muito trabalho... eu sei... Você sempre muito caprichoso!

Minha gratidão aos chicos Eduard Diego, Fanny, Melissa Isabel e Yusara, gracias, muchas gracias!

Aos professores Dra Michele Issa, Dr. Fabio Dias, Dr. Vinicius Bezzon pela contribuição no trabalho e por todo aprendizado!

Ao Flavio Machado e Giovanna Sayuri da Faculdade de Geociências pela parceria!

Ao Fernando Pereira (o Jaca) minha eterna gratidão por toda ajuda e aprendizado!

Um agradecimento especial ao David Lima e Alexandre Spitalere da secretaria da FCF/USP.

Aos técnicos do Instituto de Química da USP Roberto Bertoza e Renato Vieira por toda ajuda e paciência!

Aos sócios da Lithocálcio Marcelo Marotti, Angelo Baptista e Chao En Hung por disponibilizarem o *Lithothamnium calcareum* e acreditarem na pesquisa! Foi um desafio enorme, mas também será um sucesso! Minha imensa gratidão!

À Agência USP de Inovação por todo apoio, pois o nosso conhecimento gerou uma inovação!!!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

SILVA, Rosana Pereira. **Pré- formulação, reologia e dissolução de *Lithothamnium calcareum* utilizado como suplemento de cálcio.** 2021. 167p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Lithothamnium calcareum (*L. calcareum*) é uma alga marinha da família Corallinacea, que tem como componente principal o carbonato de cálcio (CaCO_3) na forma de precipitado, além de magnésio e diversos oligoelementos. O trabalho aqui apresentado foi dividido em cinco capítulos, e o objetivo do primeiro capítulo foi abordar a utilização da alga *L. calcareum* como fonte de cálcio para suplementação alimentar. No segundo capítulo estudamos e discutimos o CaCO_3 proveniente da alga marinha *L. calcareum*, com relação às suas propriedades físicas, químicas, mineralógicas e isotópicas (carbono e oxigênio), comparando-o com CaCO_3 mineral e CaCO_3 de ostra, também aplicados para suplementação de cálcio. No terceiro capítulo apresentamos os resultados da reometria de pós úmidos com base em delineamento estatístico, contemplando as melhores condições para a produção posterior de grânulos de diferentes fontes de carbonato de cálcio, incluindo *L. calcareum*. No quarto capítulo, estudamos os perfis de dissolução de comprimidos de cálcio disponíveis no mercado farmacêutico brasileiro e comparamos com uma formulação de *L. calcareum* que foi produzida experimentalmente em nosso laboratório de Desenvolvimento e Inovação Farmacotécnica (DEINFAR). Por fim, o quinto capítulo se trata de uma patente oriunda desse projeto que protege uma formulação sólida contendo vitamina D e sal de cálcio para tratar ou prevenir condições relacionadas a baixas concentrações de cálcio no sangue. Nesse capítulo é descrito a novidade, atividade inventiva e aplicação industrial da pesquisa aqui realizada.

Palavras chave: *Lithothamnium calcareum*, carbonato de cálcio, reômetro de pós úmidos, pré-formulação, dissolução, comprimidos.

ABSTRACT

SILVA, Rosana Pereira. **Preformulation, rheology and dissolution of *Lithothamnium calcareum* used as a calcium supplement.** 2021. 167p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Lithothamnium calcareum (*L. calcareum*) is kelp from the Corallinacea family, whose main component is calcium carbonate (CaCO_3) in the form of a precipitate, in addition to magnesium and various trace elements. The work presented here was divided into five chapters, and the objective of the first chapter was to address the use of *L. calcareum* algae as a source of calcium for food supplementation. In the second chapter, we study and discuss CaCO_3 from seaweed *L. calcareum*, concerning its physical, chemical, mineralogical, and isotopic properties (carbon and oxygen), comparing it with mineral CaCO_3 and oyster CaCO_3 , also applied for supplementation of calcium. In the third chapter, we present the results of wet powder rheometry based on a statistical design, contemplating the best conditions for the subsequent production of granules from different sources of calcium carbonate, including *L. calcareum*. In the fourth chapter, we studied the dissolution profiles of calcium tablets available in the Brazilian pharmaceutical market and compared them with a formulation of *L. calcareum* that was produced experimentally in our Pharmaceutical Development and Innovation laboratory (DEINFAR). Finally, the fifth chapter is a patent from this project that protects a solid formulation containing vitamin D and calcium salt to treat or prevent conditions related to low concentrations of calcium in the blood. This chapter describes the novelty, inventive step and industrial application of the research carried out here.

Palavras chave: *Lithothamnium calcareum*, calcium carbonate, wet powder rheometer, preformulation, dissolution, mini-tablets.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

LITHOTHAMNIUM CALCAREUM: FONTE DE CÁLCIO NA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR	26
1. INTRODUÇÃO	28
2. METODOLOGIA	30
3. A ALGA <i>LITHOTHAMNIUM CALCAREUM</i>	31
3.1 Corallinales	35
4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE <i>LITHOTHAMNIUM CALCAREUM</i>	35
5. REPOSIÇÃO DE CÁLCIO	41
6. <i>LITHOTHAMNIUM CALCAREUM</i> NA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR ANIMAL...	42
7. IMPACTO AMBIENTAL	43
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
9. REFERÊNCIAS	45

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DE CARBONATO DE CÁLCIO PROVENIENTE DA ALGA MARINHA <i>LITHOTHAMNIUM CALCAREUM</i>, POTENCIAL PRINCÍPIO ATIVO EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES	54
1. INTRODUÇÃO	56
2. MATERIAL e MÉTODOS	57
2.1 Amostras	57
2.2 Avaliação do fluxo dos pós	57
2.3 Área superficial e porosidade	58
2.4 Análise térmica	59

2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)	60
2.6 Difração de raios-x	60
2.7 Análise de componentes principais	61
2.8 Análises químicas	61
2.9 Análise de isótopos estáveis	61
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	62
4. CONCLUSÃO	79
5. REFERÊNCIAS	81

CAPÍTULO III

REOMETRIA DE PÓS ÚMIDOS: AS MELHORES CONDIÇÕES PARA GRANULAÇÃO ÚMIDA EMPREGANDO DILUENTE E AGLUTINANTE EM AMOSTRAS DE CARBONATO DE CÁLCIO	86
1. INTRODUÇÃO	88
2. MATERIAL e MÉTODOS	89
2.1 Material	89
2.2 Métodos	89
2.2.1 Caracterização das amostras	89
2.2.1.1 Análise de tamanho de partículas	89
2.2.1.2 Densidade verdadeira	90
2.2.2 Reometria de torque	90
2.2.2.1 Delineamento dos experimentos	92
2.2.2.2 Análise estatística	93
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO	94
4. CONCLUSÃO	109

5. REFERÊNCIAS	110
----------------------	-----

CAPÍTULO IV

PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE CÁLCIO CONSUMIDOS COMO SUPLEMENTO ALIMENTAR	114
-------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

1. INTRODUÇÃO	116
---------------------	-----

2. MATERIAL e MÉTODOS	117
-----------------------------	-----

2.1 Amostras	117
--------------------	-----

2.2 Reagentes	118
---------------------	-----

2.3 Descrição dos comprimidos de cálcio e caracterização	118
----------------------------------------------------------------	-----

2.4 Difração de raios-x	119
-------------------------------	-----

2.5 Instrumentação e metodologia	119
----------------------------------------	-----

2.5.1 Teor de cálcio	119
----------------------------	-----

2.5.2 Quantificação do cálcio no ensaio de dissolução	120
-------------------------------------------------------------	-----

2.5.3 Linearidade	120
-------------------------	-----

2.6 Ensaio de dissolução	120
--------------------------------	-----

2.6.1 Análise estatística	122
---------------------------------	-----

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO	122
---------------------------------	-----

3.1 Caracterização das amostras	122
---------------------------------------	-----

3.2 Difração de raios-x por pó	125
--------------------------------------	-----

3.3 Dissolução	128
----------------------	-----

3.4 Análise estatística	130
-------------------------------	-----

3.4.1 Componentes principais	130
------------------------------------	-----

3.4.2 Análise de variância e Teste de Tukey	133
---------------------------------------------------	-----

4. CONCLUSÃO	135
--------------------	-----

5. REFERÊNCIAS	136
----------------------	-----

CAPÍTULO V

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA SÓLIDA CONTENDO VITAMINA D E SAL DE CÁLCIO, MÉTODO PARA TRATAR OU PREVENIR CONDIÇÕES RELACIONADAS A BAIXA INGESTÃO E/OU MAIOR NECESSIDADE DE CÁLCIO, USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA SÓLIDA E PRODUTO FARMACÊUTICO OU SUPLEMENTAR PERFIS DE DISSOLUÇÃO DE <i>LITHOTHAMNIUM CALCAREUM</i> E PRODUTOS DO MERCADO CONTENDO CÁLCIO	139
Comprovativo da submissão eletrônica	140
Descrição	141
Título da invenção	141
Campo da invenção	141
Antecedentes da invenção	141
Sumário da invenção	144
Breve descrição da figura	146
Descrição detalhada da invenção	147
Matriz contendo cálcio e vitamina D	147
Revestimento externo com vitamina D	150
Composição farmacêutica sólida	151
Exemplos – concretizações	154
Desenvolvimento da matriz contendo <i>Lithothamnium calcareum</i> (250 mg) e vitamina D ₃ (400 UI) com liberação prolongada	154
Granulação por via úmida	154
Desenvolvimento das composições de minicomprimidos	155
Caracterização da matriz contendo <i>Lithothamnium calcareum</i> (250 mg) e vitamina D ₃ (400 UI) com liberação prolongada	157

Resultado da caracterização da matriz contendo <i>L. calcareum</i> (250 mg) e vitamina D3 (400 UI) com liberação prolongada	158
Desenvolvimento do revestimento externo	160
Aplicação do revestimento na matriz de liberação prolongada	160
Reivindicações	161
Resumo	164
REFERÊNCIAS	166

LISTA DE SIGLAS

ACP	Análise de componentes principais
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BET	Brunauer-Emmelt-Teller
CMC _{PH101}	Celulose microcristalina PH101
ED	Eficiência de dissolução
EDS	Energia dispersiva
ETR	Elementos terras raras
EUA	Estados Unidos da América
IC	Índice de compressibilidade
L/S _{max}	Razão Líquido/Sólido máximo (mL/g)
<i>L. calcareum</i>	<i>Lithothamnium calcareum</i>
HCl	Ácido clorídrico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTR	Mixer Torque Rheometer
p/p^0	Pressão relativa
ppm	Parte por milhão
RH	Razão de Hausner
TMD	Tempo médio de dissolução
T _{max}	Torque máximo
UI	Unidades Internacionais
USP	United States Pharmacopeia
USP	Universidade de São Paulo
V-PDB	Vienna Pee Dee Belemnite

LISTA DE SÍMBOLOS

Al	Alumínio	Mg	Magnésio
As	Arsênio	Mn	Manganês
Ba	Bário	Mo	Molibdênio
Br	Bromo	Na	Sódio
Ca ⁺⁺	Cálcio elementar	Nb	Nióbio
C	Carbono	Nd	Neodímio
Ca	Cálcio	N	Nitrogênio
CaCO ₃	Carbonato de cálcio	N.m	Newton x massa
Cd	Cádmio	O	Oxigênio
Ce	Cério	P	Fósforo
Cl	Cloro	Pb	Chumbo
CO ₃	Íon de carbonato	Pr	Praseodímio
Cr	Cromo	Rb	Rubídio
Cs	Césio	S	Enxofre
Cu	Cobre	Sc	Escândio
D	Diâmetro	Se	Selênio
Dy	Disprósio	Si	Silício
Fe	Ferro	Sm	Samário
Eu	Európio	Sr	Estrôncio
Er	Érbio	Tb	Térbio
Gd	Gadolínio	Th	Tório
Ho	Hólmio	Tm	Túlio
Hf	Háfnio	U	Urânio
K	Potássio	Y	Itróio
La	Lantânio	Yb	Íterbio
Lu	Lutécio	Zn	Zinco
Mm	Micrômetro	Zr	Zircônio
mg	Miligramas	$\delta^{13}\text{C}$	Isótopos estáveis de carbono
mL/g	Mililitros por grama	$\delta^{18}\text{O}$	Isótopos estáveis de oxigênio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Distribuição geográfica de espécies do gênero <i>Lithothamnium</i>	32
Tabela 1.2 – Elementos essenciais de acordo com a classificação da OMS	36
Tabela 1.3 – Ingestão recomendada (mg / dia) de elementos essenciais para mulheres (M) e homens (H)	37
Tabela 1.4 – Oligoelementos e suas funções no organismo	38
Tabela 1.5 – Composição química de <i>Lithothamnium</i> coletadas em diferentes pontos na costa brasileira e europeia entre os anos de 1963-2018.....	40
Tabela 1.6 - Ingestão diária de cálcio em mg / dia dado pela Fundação Internacional de Osteoporose (IOF)	42
Tabela 2.1 - Propriedades de fluxos das amostras de CaCO ₃ : densidade aparente, densidade compactada, índice de compressibilidade e razão de Hausner de <i>L. calcareum</i> , CaCO ₃ mineral e CaCO ₃ de ostra	63
Tabela 2.2 - Área superficial, volume e tamanho do poro das amostras de <i>L. calcareum</i> , CaCO ₃ mineral e CaCO ₃ de ostra	64
Tabela 2.3 - Resultados termoanalíticos para as amostras de CaCO ₃ : <i>L. calcareum</i> , CaCO ₃ mineral e CaCO ₃ de ostra	66
Tabela 2.4 - Teores de elementos traços (ppm) das amostras (em duplicata) de <i>L. calcareum</i> , CaCO ₃ mineral e CaCO ₃ de ostra	74
Tabela 3.1 - Variáveis e os respectivos níveis (-1, 0, +1) empregados no delineamento experimental fatorial completo	91
Tabela 3.2 - Matriz de ensaio com fatorial completo (3 ²) de 9 formulações + 2 pontos centrais.	93

Tabela 3.3 - Tamanho de partículas (μm) das amostras de carbonato de cálcio. d_{10} , d_{50} e d_{90} correspondem a porcentagem (%) das partículas	95
Tabela 3.4 - T_{max} e razão L/S_{max} para as amostras <i>Lithothamnium calcareum</i> , carbonato de cálcio mineral e carbonato de cálcio de ostra	99
Tabela 4.1 - Amostras contendo diferentes sais de cálcio adquiridos no mercado na forma de comprimidos para o estudo de dissolução	118
Tabela 4.2 - Condições empregadas nos ensaios de dissolução de cálcio	121
Tabela 4.3 - Aspecto visual dos comprimidos de cálcio e da formulação contendo <i>L. calcareum</i>	123
Tabela 4.4 - Peso médio (g), dureza (Kgf), espessura (cm), diâmetro (cm), tempo de desintegração (minutos), teor de Ca^{++} (mg) e teor de Ca^{++} e (%), com dados expressos em média \pm desvio padrão	124
Tabela 4.5 - Distribuição das fases cristalinas em porcentagem \pm desvio padrão para cada produto	127
Tabela 4.6 - Média de cálcio dissolvido (%), tempo médio de dissolução (TMD_{min}), porcentagem da eficiência de dissolução (ED) e \pm desvio padrão	130
Tabela 4.7 – Apresentação dos 4 grupos sugerida pela ACP	132
Tabela 4.8 – ANOVA para os resultados de ED	133
Tabela 4.9 – Agrupamento das amostras resultante da aplicação do Teste de Tukey	134
Tabela 5.1 – Composição do granulado para o desenvolvimento das formulações de minicomprimidos de liberação prolongada	155
Tabela 5.2 – Variáveis e os respectivos níveis empregados no delineamento experimental 2^2 para a produção dos minicomprimidos de liberação prolongada	155

Tabela 5.3 – Matriz de ensaio com fatorial fracionado de 2^2 , resultando em 4 formulações nas quais foram distribuídas aleatoriamente pelo software Statística 13.0 (Dell Inc., Tulsa, USA, 2015). Quantidade dada em porcentagem	156
Tabela 5.4 – Componentes das formulações (%) de minicomprimidos de liberação prolongada contendo 250 mg de Ca^{++} e 400 UI de vitamina D_3 , sendo 200 UI no núcleo e 200 UI no revestimento	156
Tabela 5.5 – Caracterização das formulações de minicomprimidos com as respectivas médias e \pm desvio padrão	158
Tabela 5.6 – Friabilidade das formulações	159
Tabela 5.7 – Desintegração dos minicomprimidos e \pm desvio padrão	159
Tabela 5.8 – Doseamento de cálcio (Ca^{++}) das formulações de minicomprimidos	160

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: A alga marinha <i>Lithothamnium calcareum</i> com a representação da estrutura do carbonato de cálcio, e alguns oligoelementos presentes em sua composição	29
Figura 1.2: Representação da metodologia de pesquisa aqui adotada	30
Figura 1.3: Alga marinha <i>Lithothamnium calcareum</i> da família Corallinacea. Essa é uma espécie que tem como característica principal a formação de carbonato de cálcio na forma de precipitado em sua parede celular	31
Figura 1.4: Representação esquemática da classificação taxonômica da espécie <i>Lithothamnium calcareum</i>	31
Figura 1.5: Esquema do ciclo da alga marinha <i>Lithothamnium calcareum</i> até a etapa de consumo	34
Figura 2.1: Perfis de isotermas tipo III de adsorção e dessorção das amostras. O primeiro gráfico representa os perfis comparativos das amostras de CaCO ₃ conforme as escalas	65
Figura 2.2: Perfis TG e DTG das amostras de CaCO ₃ : <i>L. calcareum</i> , CaCO ₃ mineral e CaCO ₃ de ostra	66
Figura 2.3: Imagens de elétrons secundários (MEV) com uma magnificação de 40000x e EDS da amostra da amostra de <i>L. calcareum</i>	69
Figura 2.4: Imagens de elétrons secundários (MEV) com uma magnificação de 100000x e EDS da amostra de CaCO ₃ mineral	70
Figura 2.5: Imagens de elétrons secundários (MEV) com uma magnificação de 2108x e EDS da amostra de CaCO ₃ de ostra	71
Figura 2.6: Difrátogramas de difração de raios-x das amostras de <i>L. calcareum</i> , CaCO ₃ mineral e CaCO ₃ de ostra	72

Figura 2.7: Gráficos de componentes principais: 1- distribuição das amostras <i>L. calcareum</i> (A), carbonato de cálcio mineral (B) carbonato de cálcio de ostra (C), conforme tendências observadas na análise multivariada e 2 - gráfico bidimensional de componentes principais. Ambos os Fatores 1 e 2 correspondem a 100% das informações contidas nas variáveis originais.....	73
Figura 2.8: Padrões de elementos terras raras das amostras de carbonatos normalizados pela composição média da crosta terrestre	76
Figura 2.9: Distribuição de elementos traços das amostras de carbonatos normalizados pela composição média da crosta terrestre	77
Figura 2.10: Isótopos estáveis de carbono ($d^{13}C$) e oxigênio ($d^{18}O$) dos carbonatos analisados, em referência ao padrão V-PDB. As hachuras indicam o campo de composição isotópica de algas carbonáticas do nordeste do Brasil (Rocha, 2013) e de $CaCO_3$ de ostra da costa sudeste dos EUA...	78
Figura 3.1: Representação do equipamento MTR. As lâminas rotativas está no compartimento da amostra	91
Figura 3.2: Histograma de valores cumulativos das amostras de <i>Lithothamnium calcareum</i> (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C)	93
Figura 3.3: Testes prévios no MTR pelo Método de Múltipla Adição, que utilizou a goma gelana em solução 0,03%, goma gelana 0,5%, 5% e 10% com a adição da água	97
Figura 3.4: Testes prévios no MTR pelo Método de Múltipla Adição, que utilizou a pectina em 5% e 10% com a adição da água	97
Figura 3.5: Experimentos em equipamento de reometria de torque que utilizou diluente celulose microcristalina e os aglutinantes goma de gelana e pectina e a mistura pectina e goma gelana para <i>Lithothamnium calcareum</i> (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C)	98

Figura 3.6: Experimento 5 realizado no equipamento MTR, que aplicou o diluente celulose microcristalina PH101 (20%) e os aglutinantes goma gelana e pectina (5-5%) para <i>Lithothamnium calcareum</i> (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C)	100
Figura 3.7: Experimento 9 com a mistura diluente celulose microcristalina PH101 (30%) e o aglutinante pectina (10%) para <i>Lithothamnium calcareum</i> (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C) na determinação do T_{max}	101
Figura 3.8: 1: Experimentos contendo o diluente celulose microcristalina PH101 e o aglutinante goma gelana 10% para <i>Lithothamnium calcareum</i> (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C) na determinação do T_{max} . 2: Experimentos contendo o diluente celulose microcristalina PH101 e o aglutinante pectina 10% para <i>Lithothamnium calcareum</i> (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C) na determinação do T_{max} . 3: Experimentos contendo o diluente celulose microcristalina e a mistura dos aglutinantes goma gelana-pectina (5-5%) para <i>Lithothamnium calcareum</i> (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C) na determinação do T_{max}	102
Figura 3.9: Gráficos de Pareto que representaram a análise de variância e seus componentes lineares (L) e quadráticos (Q) dos parâmetros de torque (1) e água (2) - (diluente-aglutinante) de amostras de <i>Lithothamnium calcareum</i> (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C). Valores absolutos significativos para $p < 0,05$	105
Figura 3.10: Gráficos de superfície de resposta indicando o efeito diluente-aglutinante no torque (1) e água (2) para as amostras de <i>Lithothamnium calcareum</i> (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C)	105
Figura 3.11: Gráficos das médias de torque (1) e água (2), indicando o efeito diluente-aglutinante para as amostras de <i>Lithothamnium calcareum</i> (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C)	106

Figura 3.12: Processo de saturação de líquido no aglomerado de partículas. Representação esquemática utilizando o perfil da relação razão líquido/sólido e torque máximo do experimento 8 da amostra de carbonato de cálcio de ostra	107
Figura 4.1: Gráfico de Rietveld para as amostras de 1: <i>Lithothamnium</i> (Rwp = 9,38%, gof = 1,98), 2: (Rwp = 10,63%, gof = 2,04), 3: (Rwp = 7,44%, gof = 2,40), 4: (Rwp = 13,55% 2,59), 5: (Rwp = 12,99%, gof = 2,50) e 6: (Rwp = 7,72%, gof = 1,68)	126
Figura 4.2: Padrões para as amostras D e G	127
Figura 4.3: Perfis de dissolução das amostras de cálcio e <i>L. calcareum</i> . Os valores correspondem a média de 3 determinações para cada amostra e as barras representam o desvio padrão	128
Figura 4.4: A: Gráficos de componentes principais: A - distribuição das amostras para comparação. B - gráfico bidimensional de componentes principais. Ambos os Fatores 1 e 2 correspondem a 84,01% das informações contidas nas variáveis originais	131
Figura 4.5: Intervalos de confiança (95) de Tukey em função dos resultados de ED ..	134
Figura 5.1: Perfil de liberação do cálcio destacado pela curva crescente de liberação do ativo ao longo do tempo	165

CAPÍTULO I

***Lithothamnium calcareum*: fonte de cálcio na suplementação alimentar**

***LITHOTHAMNIUM CALCAREUM*: FONTE DE CÁLCIO NA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR**

RESUMO

Lithothamnium calcareum é uma alga marinha de coloração avermelhada presente nos mares europeus e na costa brasileira, sendo essa espécie um dos maiores depósitos biogênicos de carbonato de cálcio do mundo. Além do cálcio, contém magnésio e oligoelementos, fazendo desta alga um potencial constituinte para suplementos alimentares na dieta humana e de animais. A ingestão inadequada de cálcio na dieta alimentar pode levar ao surgimento da osteoporose, que é uma doença de grande prevalência no mundo. Entretanto, o impacto ambiental da retirada de depósitos de *L. calcareum* do mar é considerável e, atualmente, existe a preocupação de se conservar esses depósitos. Assim, para além de representar uma alternativa interessante na prevenção da osteoporose, o uso farmacêutico do carbonato de cálcio proveniente de *L. calcareum* poderá reduzir o volume de sua exploração, contribuindo para uma retirada menos predatória dos depósitos desta alga.

Palavras-chave: *Lithothamnium calcareum*, carbonato de cálcio, alga marinha; fonte natural de cálcio, osteoporose, suplemento alimentar

1. INTRODUÇÃO

Lithothamnium calcareum (*L. calcareum*) é uma alga marinha da família Corallinacea¹ muito abundante nos mares europeus. Com sua coloração avermelhada típica, tem como constituinte principal o carbonato de cálcio na forma de precipitado² e presença de cristais de calcita³ em suas paredes celulares, além de conter uma composição altamente variável de oligoelementos.^{4,5} O carbonato de cálcio proveniente da alga marinha *L. calcareum* exibe em sua composição oligoelementos⁵ de forma que se apresenta como um interessante e potencial constituinte para suplementos alimentares.^{6,7}

É importante salientar que o consumo de algas marinhas é bastante tradicional, especialmente nos países asiáticos e, dentre os países europeus, destaca-se a França. Além do consumo humano, as algas servem de alimento para inúmeras espécies que posteriormente serão consumidas pelo homem.⁸

Por outro lado, a osteoporose é uma doença óssea metabólica, caracterizada por baixa resistência e deterioração micro arquitetural do tecido ósseo que pode levar a fraturas. Essa doença afeta milhões de pessoas no mundo, com tendência de aumento, conforme se registra o envelhecimento da população. A estimativa é que, até o ano de 2050, a incidência aumente quatro vezes, justamente pelo número crescente de pessoas mais velhas.⁹ Um dos principais fatores que leva a osteoporose é a ingestão inadequada de cálcio na dieta alimentar. O cálcio é um componente essencial em toda vida e a suplementação desse mineral pode ser fundamental para a prevenção da doença.¹⁰

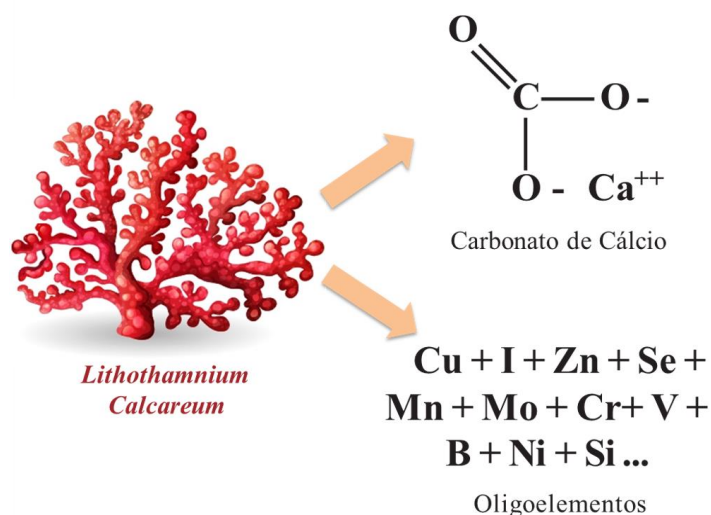
Da infância à adolescência (1-18 anos) a ingestão de cálcio pode variar de 700-1300 mg/dia, mulheres (19-50 anos) de 1000-1300 mg/dia, enquanto homens (19-70 anos) entre 1000-1200 mg de cálcio por dia. Para alcançar a quantidade diária de cálcio recomendada é necessária uma alimentação equilibrada, especialmente com consumo de leite e derivados. No entanto, se uma deficiência de cálcio for detectada é importante recorrer a suplementação deste importante mineral.¹⁰

Estudos em animais indicaram que a suplementação de cálcio com *L. calcareum* é capaz de melhorar a biodisponibilidade deste mineral e o tamanho do fêmur em

ratos,¹¹ além de manter a estrutura e prevenir da perda óssea.¹² Em estudos clínicos piloto, a suplementação foi capaz de melhorar as condições de osteoartrite de joelho,¹³ inclusive, com redução da necessidade do uso de anti-inflamatórios não esteroidais.¹⁴

Nesse contexto, a utilização de fontes de cálcio de origem marinha como o *L. calcareum* representa uma vantagem, uma vez que, em sua composição, é possível encontrar quantidade significativa de magnésio e vários oligoelementos, conforme ilustrado na Figura 1.1.¹⁵ Além disso, há também pesquisas sobre a aplicação das algas marinhas no desenvolvimento de novos produtos cosméticos,¹⁶ farmacêuticos e nutracêuticos,¹⁷ agrícolas¹⁸ e veterinários.¹⁹

Figura 1.1: A alga marinha *Lithothamnium calcareum* com a representação da estrutura química do carbonato de cálcio e de alguns oligoelementos presentes em sua composição.



Muito embora o cálcio esteja presente em vários alimentos, infelizmente, por diversos motivos, sua ingestão diária recomendada nem sempre é alcançada para um número significativo de pessoas ao redor do mundo. Portanto, a suplementação de cálcio pode ser muito importante em várias situações, dentre as quais se destaca a baixa ingestão de laticínios que é uma importante fonte de cálcio na dieta humana.²⁰

A perspectiva de consumo de suplementos de cálcio está aumentando gradativamente em muitos países^{20,21} e o *L. calcareum* se apresenta como uma alternativa para inclusão em formulações para prevenção da osteoporose com a vantagem de conter, conforme já mencionado, magnésio e oligoelementos.

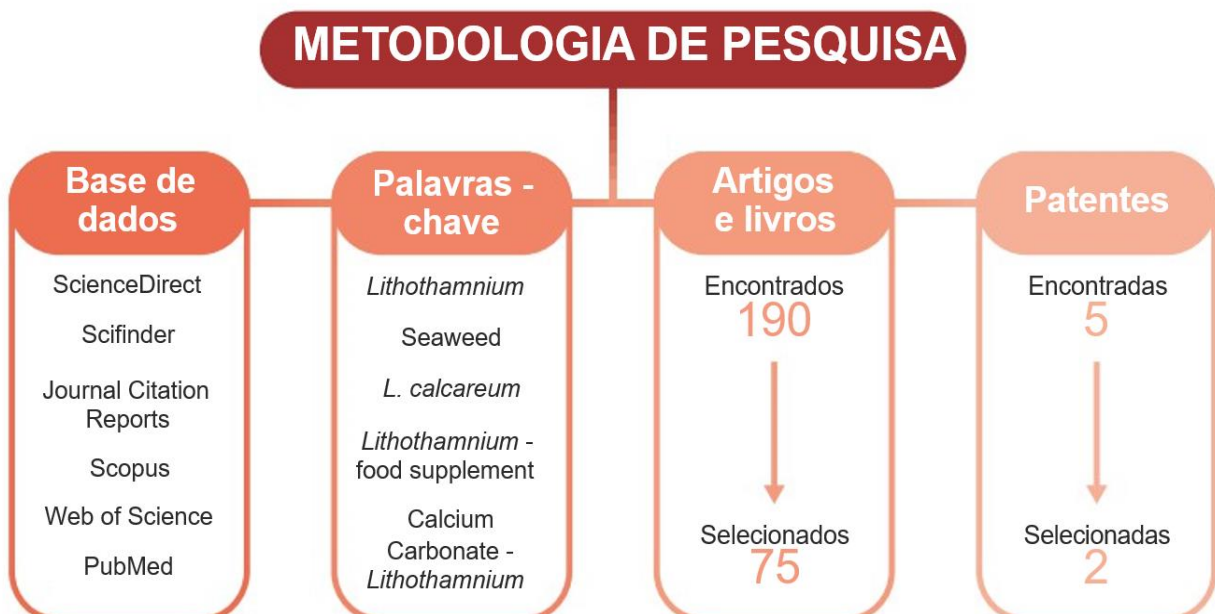
Uma estimativa de mercado de suplementos multivitamínicos e minerais de venda livre nos mercados da Europa, Oriente Médio e Índia projetou uma taxa de crescimento de 10,7% ao ano (2020-2027). Este mercado é avaliado em US\$6,51 bilhões (2019) e os suplementos de cálcio são um importante componente dessa categoria, respondendo por 35% dessa receita. Outro aspecto interessante nessa estimativa de mercado é que a principal forma farmacêutica na qual esses suplementos se apresentam são os comprimidos.²²

Apesar das vantagens do *L. calcareum* como fonte de cálcio, a literatura científica é escassa de artigos que tratam da utilização dessa fonte de cálcio na suplementação alimentar. Assim, o objetivo desse trabalho é exatamente preencher essa lacuna.

2. METODOLOGIA

Para a realização do levantamento bibliográfico foi determinado como partida a seleção das bases de dados, para uma análise abrangente do termo *Lithothamnium calcareum*. A pesquisa compreendeu artigos publicados no período de 1895 a 2020, incluindo livros de autores renomados, além dos sites da World Health Organization (WHO) e International Osteoporosis Foundation (IOF). A Figura 1.2 ilustra a metodologia aqui empregada.

Figura 1.2: Representação da metodologia de pesquisa aqui adotada.



3. A ALGA *LITHOTHAMNIUM CALCAREUM*

O gênero *Lithothamnium* surgiu no período Jurássico, há cerca de 145 milhões de anos, na era mesozóica.^{23,24} O *L. calcareum* (Figura 1.3) também conhecido por *Mäerl* (termo usado na França) é uma das espécies proveniente do filo das Rhodophytas, pertencente à família Corallinacea e ordem Corallinales (Figura 1.4).²⁵

Figura 1.3: Alga marinha *Lithothamnium calcareum* da família Corallinacea. Essa espécie tem como característica principal a formação de carbonato de cálcio na forma de precipitado em sua parede celular.

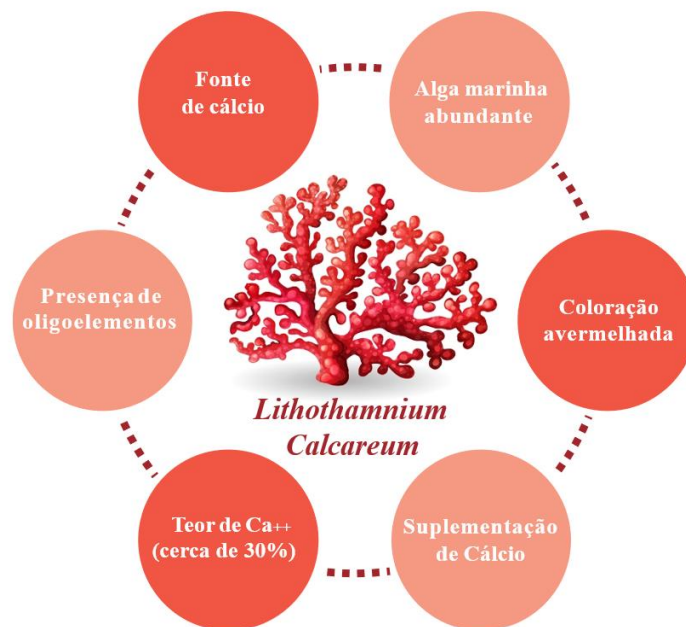
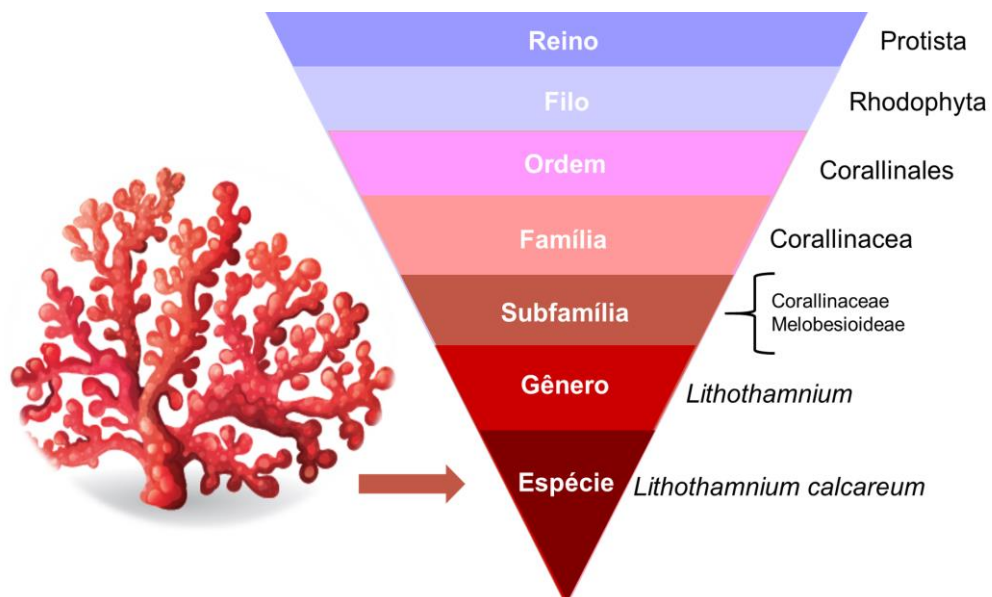


Figura 1.4: Representação esquemática da classificação taxonômica da espécie



O cálcio é depositado nas paredes celulares da alga e em sua composição é encontrada a maior parte de calcita.³ Por essa razão, o *L. calcareum* distribuído em diversas regiões, pode conter cerca de 30,0%⁵ de cálcio em sua composição química e essa característica pode variar conforme a região. A formação de carbonato de cálcio em sua parede celular na forma de precipitado é uma característica dominante da espécie *Lithothamnium*.^{2,27} No entanto, as espécies de algas vermelhas são inúmeras e podem ser observadas, em parte, na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Distribuição geográfica de espécies do gênero *Lithothamnium*.

Subfamília	Espécie	Local	Referências
Corallinaceae	<i>Lithothamnium</i>	Costa norueguesa	Foslie, 1895
	<i>Lithothamnium corallioides</i> <i>Crouan</i> and <i>Phymatolithon calcareum</i>	Costa e nas águas costeiras de Galway, Donegal e Irlanda do Norte	Wilson, 1979
	<i>Lithothamnium-rich</i>	Águas escocesas	Wilson, 1979
	<i>Lithothamnium calcareum</i> , <i>Lithothamnium fruticulosum</i>	Mediterrâneo, Mar de Mármara e Estreito de Bósforo (Turquia)	Ergin et al., 1990
	<i>Lithothamnion heterocladum</i> (corallinales)	Província da Terra do Fogo (Argentina)	Navarro et al., 2010
	<i>Lithothamnion calcareum</i> , <i>Phymatolithon calcareum</i>	Sudoeste da costa da Irlanda e costa noroeste da Islândia	Zhu et al., 2014
	<i>Lithothamnion calcareum</i>	Litoral do Estado do Espírito Santo (Brasil)	Veneu, et al., 2018
Corallinaceae e Melobesioideae	<i>Lithothamnium corallioides</i> , <i>Phymatolithon calcareum</i> , <i>Lithothamnium fruticulosum</i> (rhodoliths)	Ilha de Capraia (Itália)	Basso & Tomaselli, 1994
	<i>Lithothamnium</i>	Litoral do Estado do Ceará (Brasil)	Nascimento, Freire, Miola, 2010
	<i>Lithothamnion</i> , <i>Lithophyllum</i> , <i>Hydrolithon</i> , <i>Neogoniolithon</i> e	Litoral do Estado do Espírito Santo (Brasil)	Dias, 2012; Henriques et al., 2012

	<i>Sporolithon, L. corallinae</i> (rhodoliths)		
Melobesioideae	<i>Lithothamnium calcareum</i>	Baía de Brest, Vale Châteaulin e Baía Daoulas (França)	Guilcher, 1964
	<i>Lithothamnium calcareum</i> (Rhodoliths)	Irvine, Norte de Ayrshire (Escócia)	Boyd, 1986
	<i>Lithothamnium</i>	Litoral do Estado do Rio Grande do Norte (Brasil)	Queiroz et al., 2016

É muito provável que o *Lithothamnium* tenha sido primeiro encontrado na costa francesa. Guilcher,⁴ ao estudar a Baía de Brest, na França, encontrou sedimentos calcareos em abundância e verificou que a fração fina deste material era proveniente quase exclusivamente de *L. calcareum*. Foi constatado, ainda, que o *Lithothamnium* era pouco comum nos vales mais profundos da baía, uma vez que estes locais não favoreciam o crescimento da alga.

Em 1980 foram encontrados na costa escocesa, amplos depósitos calcáreos, mais especificamente em Irvine, Ayrshire. Esses depósitos eram provenientes de *Lithothamnium* em elevada quantidade, composto também por fósseis de conchas, além de outros depósitos marinhos.³⁶

Na América do Sul, a plataforma continental brasileira está constituída por sedimentos recentes, com destaque para a plataforma continental do nordeste brasileiro. Essas e outras plataformas no Brasil compreendem o mais extenso ambiente de deposição carbonática do mundo³⁸ e o cálcio proveniente de *L. calcareum* é majoritariamente explorado para correção de solos ácidos. As algas marinhas dessa espécie atingiram uma vasta extensão na costa cearense e é predominante em toda a área do Estado do Rio Grande do Norte, o que torna esse recurso natural de grande importância.^{26,37} Posteriormente, foi mencionado a presença da alga na plataforma do sudeste do país, que ainda é pouco explorada.³⁴

É muito comum encontrar a espécie *Lithothamnium coralloides*, conhecida também como algas coralinas. O que diferencia o *L. calcareum* de outros corais é a forma como se produz os ramos calcários.²⁷ Nesse sentido, o depósito do cálcio e

outros oligoelementos na alga marinha se desenvolvem a partir do momento em que fragmentos de outras algas se depositam nas algas calcáreas de coloração rosa avermelhada.^{34,37}

Sendo assim, para que o desenvolvimento de *L. calcareum* aconteça, o ciclo (Figura 1.5) deve se iniciar em fundos duros² ou em pedras quando é formado uma pequena camada de secreção que logo dá origem às ramificações (ramos calcários) de aspecto dicotômico.³ Nesse período, se for rompido, a sua renovação é permanente, e a partir desse ciclo, mesmo de forma lenta, um novo se inicia para obtenção dos ramos calcários contendo o carbonato de cálcio ou cristais de calcita nas paredes das células das algas coralinas.^{2,39}

Em relação ao uso do *L. calcareum* para as diversas aplicações, o processo de extração acontece a partir da colheita da alga no mar que pode ocorrer de forma manual ou mecânica, seguida de secagem do material. Na sequência, são realizados cortes dos ramos calcários para facilitar a trituração e obtenção de uma matéria-prima na forma de pó que, então, passa por processos de micronização para a comercialização.^{40,41}

Figura 1.5: Esquema do ciclo da alga marinha *Lithothamnium calcareum* até a etapa de consumo.



3.1. Corallinales

A respeito da ordem Corallinales, são conhecidas duas divisões de subfamílias: a primeira Corallinaceae e a segunda Melobesioideae.^{26,34} A diversidade da família da ordem Corallinales foi descrita por Areschoug,⁴² que detalhou suas características, assim como o habitat favorável para cada espécie. Por outro lado,²⁷ menciona a existência de mais de mil espécies de *Lithothamnium* na Costa Norueguesa.

O *L. calcareum* pertence à subfamília Melobesioideae e se desenvolve de forma livre, vivendo sobre diversas algas ou qualquer outro objeto apresentando sua ramificação (talo) simples, que contém um substrato (depósitos calcáreos), também chamado por alguns autores de rodolito.^{38,43} Alguns estudos apontaram que, dependendo do local onde ocorre o sedimento das algas calcáreas, a composição se diferenciará significativamente devido a fatores naturais,²⁹ como por exemplo o movimento da água.⁴³

Em condições adequadas de profundidade, temperatura e luz, é formado o precipitado de carbonato de cálcio ao lado das paredes celulares, principalmente sob a forma de calcita, tornando o cálcio o componente mais importante dessas algas marinhas,^{2,29,44} como por exemplo em *L. calcareum*.

4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *LITHOTHAMNIUM CALCAREUM*

A composição química do *Lithothamnium* pode variar conforme a sua origem, sendo o cálcio o principal componente encontrado em proporções na faixa de 30 %. Esta distribuição de teor pode estar relacionada com a profundidade em que a alga.²⁶ Além do mais, o magnésio é o segundo componente mais abundante nas algas marinhas.³

O cálcio, conforme aqui já mencionado, é um elemento importante no organismo, uma vez que os ossos são grandes depósitos desse mineral. Portanto, sua ingestão deveria ser relativamente elevada, dada a demanda. Entretanto, existem outros elementos químicos que são demandados em quantidades muito baixas: os chamados oligoelementos, que são minerais presentes em baixas concentrações nos

seres vivos, além dos alimentos, com valores inferiores a 250 µg /g e podem ser visualizados na Tabela 1.2.⁴⁵

Tabela 1.2 – Elementos essenciais de acordo com a classificação da WHO.⁴⁵

Essenciais	Provavelmente essenciais	Potencialmente tóxicos
Iodo (I)	Manganês (Mn)	Flúor (F)
Zinco (Zn)	Silício (Si)	Lítio (Li)
Selênio (Se)	Níquel (Ni)	Chumbo (Pb)
Cobre (Cu)	Boro (B)	Cádmio (Cd)
Molibdênio (Mo)	Vanádio (V)	Mercúrio (Hg)
Cromo (Cr)		Arsênico (As)
		Alumínio (Al)
		Estanho (Sn)

É importante destacar, que ao se tratar de oligoelementos, além de suas importâncias no metabolismo esses também podem exercer efeito tóxico quando em excesso e a contaminação ambiental é uma fonte importante de intoxicação.⁴⁶ Os oligoelementos são elementos que também tem seus valores definidos pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (Tabela 1.3) que, inclusive, indica a quantidade que deve ser consumida de cada elemento para que a população se mantenha saudável.⁴⁷

Assim como o cálcio, os oligoelementos representam um importante papel no nosso organismo (Tabela 1.4), que deve receber quantidades adequadas dessas substâncias e o *L. calcareum* é uma fonte que contém mais de 20 desses elementos.^{4,5}

Tabela 1.3 – Ingestão recomendada (mg / dia) de elementos essenciais para mulheres (M) e homens (H). Fonte: Adaptado de EFSA.⁴⁷

Idade	Cobre M / H	Ferro M / H	Fósforo	Iodo	Magnésio	Manganês	Molibdênio	Potássio	Selênio	Zinco M / H
7-11 meses	0,4 / 0,04	11 / 11	160	0,07	80	0,02-0,5	0,01	750	0,015	2,9 / 2,9
1-3	0,7 / 0,7	7 / 7	250	0,09	170	0,5	0,015	800	0,015	4,3 / 4,3
4-6	1 / 1	7 / 7	440	0,09	230	1	0,02	1,1	0,02	5,5 / 5,5
7-10	1,1 / 1,3	11 / 11	440	0,09	250	1,5	0,03	1,8	0,035	7,4 / 7,4
11-14	1,1 / 1,3	13 / 11	640	0,12	250	2	0,045	2,7	0,055	10,7 / 10,7
15-17	1,1 / 1,3	13 / 11	640	0,13	250	3	0,065	3,5	0,07	11,9 / 14,2
>18	1,3 / 1,6	16 / 11	550	0,15	300	3	0,065	3,5	0,07	7,5-12,7 / 9,4-16,3

Tabela 1.4 - Oligoelementos e suas funções no organismo. Fonte: Baseado em COMBS Jr.⁴⁸

OLIGOELEMENTOS	FUNÇÃO ESPECÍFICA
I	Regulação metabólica
Zn	Catálise enzimática; estrutura de proteína
Se	Catálise enzimática; proteção antioxidante, metabólitos antitumorigênicos
Cu	Catálise enzimática
Mo	Potencialização da ação da insulina na manutenção da tolerância à glicose
Cr	Catálise enzimática
Mn	Catálise enzimática
Si	Função reprodutiva e desenvolvimento fetal em animais
Ni	Sobrevivência fetal e anemia em experimentos com animais
B	Mineralização óssea em experimentos com animais
V	Crescimento em experimentos com animais

Outro aspecto relevante em relação aos oligoelementos é o fato de que cada um deles tem uma faixa de concentração adequada e a sua falta ou eventual excesso pode conduzir a doenças específicas.⁴⁹

Os oligoelementos essenciais são, em geral, obtidos em dietas balanceadas, com uma boa variedade de alimentos. No entanto, hábitos alimentares baseados em produtos industrializados ou do tipo “fast food” podem conduzir à deficiências destes importantes componentes.^{48,49}

Assim, a alga *Lithothamnium calcareum* se apresenta como um suplemento alimentar interessante, já que contém vários desses oligoelementos além do cálcio e magnésio. Na Tabela 1.5 são apresentados os principais trabalhos contendo os elementos químicos presentes em amostras de *Lithothamnium calcareum*.

Um aspecto ainda a ser explorado em *L. calcareum* é a presença de compostos orgânicos. Soares,⁵⁰ a partir da extração alcalina a quente, obteve 4 polissacarídeos sulfatados que apresentaram inclusive atividade anti-inflamatória em modelo de rolamento de leucócitos.

Tabela 1.5 – Composição química de *Lithothamnium* coletadas em diferentes pontos na costa brasileira e europeia entre os anos de 1963-2018.

Referências	Ca	Fe	Mg	Na	S	K	P	Al	As	B	Cd	Cr	Cu	F	Hg	I	Mn	Mo	Ni	Pb	Se	Si	V	Zn
López-Benito, 1963	+	-	+	-	-	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Assoumani, 1997	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Melo e Moura, 2009	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Nascimento, Freire, Miola, 2010	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Aslam et al., 2010	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Desideri et al., 2016	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+		+
Veneu et al., 2018	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

“-“ indica ausência ou elemento não analisado

■ elementos

■ oligoelementos

5. REPOSIÇÃO DE CÁLCIO

A ingestão diária de cálcio tem se expandido de forma gradual no mundo todo, mas a deficiência desse elemento no organismo ainda é elevada⁹ e, nesse caso, é importante complementar a dieta com suplementação de cálcio.^{51,52}

A baixa ingestão de cálcio devido aos maus hábitos alimentares pode levar a doenças, como por exemplo, a osteoporose e osteopenia.²⁰ O carbonato de cálcio é o mineral que fornece até 40 % de cálcio elementar para suplementação na dieta, e a função principal desse componente é promover a formação e manutenção e formação da matriz óssea.^{53,54}

Além disso, na suplementação de cálcio, a associação com a vitamina D, o colecalciferol, é importante para contribuir na absorção do cálcio no organismo, principalmente para aqueles com elevada insuficiência de cálcio.^{55,56,57} Alguns estudos foram realizados com a combinação de suplemento de cálcio e vitamina D, e, os resultados permitiram concluir que de fato essa associação preveniu a perda da densidade de massa óssea, além de diminuir a incidência de fratura em idosos.^{58,59,60}

A International Osteoporosis Foundation disponibilizou uma tabela com valores a serem consumidos de cálcio (Tabela 1.6). É possível observar que com o avanço da idade é necessário consumir cálcio em maior quantidade, como consequência da diminuição da capacidade do o corpo em absorver o mineral.

As formulações de suplementos alimentares para reposição de cálcio podem utilizar o cálcio de ostras, mineral ou alga marinha. Entretanto, a alga marinha *L. calcareum* tem como vantagem a presença de oligoelementos.^{53,54}

É importante destacar que existem estudos que comprovam a capacidade de prevenção da perda da densidade de massa óssea e diminuição de fraturas a partir do cálcio proveniente de *L. calcareum*.^{12,61,62} A suplementação de cálcio é comum no mundo inteiro e existem, inclusive, vários suplementos contendo *L. calcareum* como AquaMin™, que está disponível em mais de 40 países.^{11,63}

Tabela 1.6 – Ingestão diária de cálcio em mg / dia dado pela International Osteoporosis Foundation (IOF).¹⁰

Idade	Ingestão diária recomendada de cálcio (mg / dia)
0-6 meses	200
6-12 meses	260
1-3 anos	700
4-8 anos	1000
9-13 anos	1300
14-18 anos	1300
19-50 anos	1000
51-70 anos	mulheres 1200 / homens 1000
Mais de 70 anos	1200

6. **LITHOTHAMNIUM CALCAREUM NA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR ANIMAL**

A utilização de cálcio proveniente de *L. calcareum* na suplementação alimentar de animais, que se destinam ao consumo humano, é uma prática comum e de longa data em países europeus,¹² mas é recente no Brasil.⁶⁴ A inclusão de carbonato de cálcio na dieta animal apresenta diversas vantagens, como por exemplo, um melhor desempenho do ponto de vista zootécnico dos animais.^{12,64}

Existem relatos da utilização de *L. calcareum* em ovelhas,⁶⁵ que concluiu que a alga é facilmente consumida por cordeiros e um componente viável na dieta de ruminantes. Em vacas,^{66,67} inclusive da raça Nellore⁶⁸ foi aumentada a produção de leite e da proteína na lactação. Para os frangos de corte^{64,69} a suplementação contendo a alga influenciou positivamente no crescimento das aves, enquanto em leitões⁷⁰ a alga *L. calcareum* contribuiu para o crescimento dos animais, além da resistência da massa óssea.

Um ponto interessante na utilização de *L. calcareum* na alimentação de animais é que este material parece exercer outros efeitos benéficos na dieta destes animais. Um exemplo é a possibilidade de empregar a alga, que apresentou, inclusive, um efeito tamponante mais eficaz que o calcário, para facilitar a transição abrupta para dietas concentradas em gado Nelore.⁶⁸ Outro exemplo é o efeito preventivo contra aflatoxina B₁ exercido pelo *L. Calcareum* quando incluído na alimentação de frangos de corte que, além de melhorar o desempenho zootécnico dos animais, apresentou-se como um adsorvente para micotoxinas.⁶⁴

O emprego de *L. calcareum* como fonte de cálcio em rações para frangos de corte, em substituição ao cálcio calcítico, mostrou-se viável do ponto de vista zootécnico, tanto na fase de crescimento como ao longo de toda a vida do animal. Porém, neste caso, deve-se considerar que os custos envolvidos podem ser mais elevados em relação às rações tradicionais. Este é, portanto, um obstáculo razoável para utilização desta alga marinha para uso em rações para frangos, pois estas devem apresentar um custo baixo para ser considerada viável economicamente.⁶⁹

Com relação aos custos, é importante destacar que o calcáreo, que é a fonte de cálcio mais comumente utilizada na alimentação animal, apresenta um custo atrativo, o que facilita a sua utilização em rações. Entretanto, fontes de cálcio derivadas de rochas apresentam menor solubilidade e, conseqüentemente, menos biodisponibilidade, o que pode impactar o desempenho zootécnico dos animais.⁷¹

7. IMPACTO AMBIENTAL

Um assunto preocupante quando se discute a utilização de algas marinhas é o impacto ambiental da retirada deste mineral do mar. No caso dos depósitos de *Lithothamnium calcareum* não é diferente. Riosmena-Rodriguez⁷² citou que a excessiva exploração dos depósitos “maërl” na França, como por exemplo, o interesse em conservar os depósitos em outros países e a proximidade de depósitos de petróleo tem motivado a exploração da alga em outras regiões, citando o Brasil, México, Austrália e a Nova Zelândia.

Outra questão preocupante é o fato de que as algas coralinas são muito suscetíveis à acidificação do oceano, o que poderá causar grande distúrbios nestes sistemas marinhos.³⁸ Os locais onde estas algas estão disponíveis são em geral de grande biodiversidade e é muito importante desenvolver pesquisas para obter mais conhecimento sobre esses interessantes sistemas.⁷³

Áreas que foram extensivamente exploradas na Europa, em especial na França, sofrem com a degradação destes ambientes e, atualmente, a sua extração é passível de regulamentação, exigindo um plano de gestão apropriado.⁷⁴ A exploração de sedimentos calcáreos provenientes de algas marinhas na França e Reino Unido foi discutido por Hall-Spencer e colaboradores.⁷⁵ Os autores alertaram que tal atividade pode impactar consideravelmente a biodiversidade existentes nestes locais, especialmente quando se empregam práticas consideradas destrutivas, motivo pelo qual tais práticas devem ser restringidas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Lithothamnium calcareum é uma alga marinha com grande potencial para uso como suplemento alimentar humano e animal, representando uma alternativa interessante para reposição de cálcio e prevenção da osteoporose. Ademais, trata-se de material que contém magnésio e oligoelementos.

O uso farmacêutico desse material pode agregar valor ao produto e reduzir drasticamente o volume a ser explorado do fundo do oceano. Essa pode ser uma alternativa interessante para uma exploração menos predatória dos depósitos de *L. calcareum*.

9. REFERÊNCIAS¹

- [1] CABIOCH, J. Contribution a l'Étude Morphologique, Anatomique et Systématique de deux Mélobésiéc: *Lithothamnium calcareum* (Pallas) Areschoug et *Lithothamnium corallioides* Crouan. **Botanica Marina**, v.IX, 1969.
- [2] LÓPEZ-BENITO, M. Estudio de la composición química del *Lithothamnium calcareum* (Aresch) y su aplicación como corrector de terrenos de cultivo. **Inv. Pes.** v.23, p.53-70, 1963.
- [3] BAAS-BECKING, L.G.; GALLIHER, E.W. Wall Structure and Mineralization in Coralline Algae. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 35(2), p. 467–479, 1930. [doi:10.1021/j150320a006](https://doi.org/10.1021/j150320a006)
- [4] GUILCHER, A. La Sédimentation Sous-Marine Dans la Partie Orientale de la Rade de Brest, Bretagne. **Developments in Sedimentology**, v.1, p.148-156, 1964. [https://doi.org/10.1016/S0070-4571\(08\)70480-1](https://doi.org/10.1016/S0070-4571(08)70480-1)
- [5] DESIDERI, D.; CANTALUPPI, C.; CECCOTTO, F. et al. Feduzia Essential and toxic elements in seaweeds for human consumption. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, part A. v. 79, p. 112-122, 2016. <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2015.1113598>
- [6] NGUYEN, M.H.T.; JUNG, W.K.; KIM, S.K. Chapter 33 - Marine Algae Possess Therapeutic Potential for Ca-Mineralization via Osteoblastic Differentiation. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 64, p. 429-441, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387669-0.00033-8>
- [7] BRENNAN, O; STENSON, B.; WIDAA, A. et al. Incorporation of the natural marine multi-mineral dietary supplement Aquamin enhances osteogenesis and improves the mechanical properties of a collagen-based bone graft substitute. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, volume 47, pages 114-123, July 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.03.015>
- [8] FLEURENCE, J. Chapter 5 - Seaweeds as Food. **Seaweed in Health and Disease Prevention**, p. 149-167, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802772-1.00005-1>

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- [9] WORLD HEALTH ORGANIZATION, Prevention and Management of Osteoporosis, 2003. 206p., Geneva (livro). Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/42841>>. Acesso em: 2/05/2020
- [10] INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, Osteoporosis, 2020. Switzerland. <https://www.iofbonehealth.org/what-is-osteoporosis>. Acesso em 14/08/2020.
- [11] ASSOUMANI, M. B. AquaMin, a natural calcium supplement derived from seaweed. **Agro-Food-Industry Hi-Tech**. p. 45-47, 1997.
- [12] ASLAM, M.N.; KREIDER, J.M.; PARUCHURI, T. et al. A Mineral-Rich Extract from the Red Marine Algae *Lithothamnion calcareum* Preserves Bone Structure and Function in Female Mice on a Western-Style Diet. **Calcif Tissue Int.**, v.86(4), p.313-324, 2010. [doi:10.1007/s00223-010-9340-9](https://doi.org/10.1007/s00223-010-9340-9)
- [13] FRESTEDT, J.L.; WALSH, M.; KUSKOWSKI, M.A. et al. A natural mineral supplement provides relief from knee osteoarthritis symptoms: a randomized controlled pilot trial. **Nutrition Journal**, v. 7:9, p.1-8, 2008. [doi:10.1186/1475-2891-7-9](https://doi.org/10.1186/1475-2891-7-9)
- [14] FRESTEDT, J.L.; KUSKOWSKI, M.A.; ZENK, J.L. A natural seaweed derived mineral supplement (Aquamin F) for knee osteoarthritis: A randomised, placebo-controlled pilot study. **Nutrition Journal**, v. 8:7, 2009. [doi:10.1186/1475-2891-8-7](https://doi.org/10.1186/1475-2891-8-7)
- [15] MORSE, J.W.; ARVIDSON, R.S.; LÜTTGE, A. Calcium Carbonate Formation and Dissolution. **Chem. Rev.**, v. 107, p. 342–381, 2007. <https://doi.org/10.1021/cr050358j>
- [16] ARIEDE, M.B.; CANDIDO, T.M.; JACOME, A.L.M. et al. Cosmetic attributes of algae - A review. **Algal Research**, v.25, p.483-487, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.019>
- [17] NEDUMARAN, T; ARULBALACHANDRAN, D. Seaweeds: A Promising Source for Sustainable Development. **Environmental Sustainability**, p. 65-88, 2015. [DOI 10.1007/978-81-322-2056-5_4](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2056-5_4)
- [18] MCHUGH, D. J. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper, No. 441. FAO, Rome, 105p., 2003.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- [19] MORAIS, T.; INÁCIO, A.; COUTINHO, T. et al. Seaweed Potential in the Animal Feed: A Review. **J. Mar. Sci. Eng.**, v.8(559), p. 1-24, 2020. [doi:10.3390/jmse8080559](https://doi.org/10.3390/jmse8080559)
- [20] MUSCARIELLO, R.; RENDINA, D.; GIANNETTINO, R. et al. Calcium daily intake and the efficacy of a training intervention on optimizing calcium supplementation therapy: a clinical audit. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, 18 p., 3 August 2020. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.08.005>
- [21] MANGANO, K.M.; STEPHEN J.; WALSH, S.J. et al. Calcium Intake in the United States from Dietary and Supplemental Sources across Adult Age Groups: New Estimates from the National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2006. **J Am Diet Assoc.**, v. 111(5), p. 687–695, 2011 May. [doi:10.1016/j.jada.2011.02.014](https://doi.org/10.1016/j.jada.2011.02.014)
- [22] GRAN View Research. Nutraceuticals & Functional Foods. Europe, Middle East & India OTC Multivitamins & Minerals Supplements Market Report, 2020-2027. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/europe-middle-east-india-otc-multivitamins-minerals-supplements-market>>. Acesso em: 07 de janeiro de 2021
- [23] BAILEY, J.C. Molecular Systematics of Red Algae. 1996. LSU Historical Dissertations and Theses. 6316. Jeffrey Craig Bailey Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College, pg. 40 e 44 1996. Disponível em: <https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_disstheses/6316>
- [24] WRAY, J.L. Calcareous Algae. **Introduction to Marine Micropaleontology**. p. 171–187, 1998. [doi:10.1016/b978-044482672-5/50007-6](https://doi.org/10.1016/b978-044482672-5/50007-6)
- [25] WILSON, S.; BLAKE, C.; BERGES, J.A. et al. Environmental tolerances of free-living coralline algae (maërl): implications for European marine conservation. **Biological Conservation**, v. 120, p. 279–289, 2004. [doi:10.1016/j.biocon.2004.03.001](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.03.001)
- [26] NASCIMENTO, F.S.; FREIRE, G.S. S.; MIOLA, B. Geochemistry of marine sediments of the brazilian northeastern continental shelf. **Brazilian Journal of Oceanography**, v.58 (1), 11p., 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-87592010000600002>

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- [27] FOSLIE, M. The Norwegian forms of *Lithothamnion*. Kongelige Norske Videnskabers Selskabs Skrifter 1894: p.29-208, 1895.
- [28] WILSON, J. B. Biogenic carbonate sediments on the scottish continental shelf and on rockall bank. **Marine Geology**, v.33, p.85-93, 1979. [https://doi.org/10.1016/0025-3227\(79\)90076-8](https://doi.org/10.1016/0025-3227(79)90076-8)
- [29] ERGIN, M.; BODUR, M.N.; EDIGER, V. Distribution of surficial shelf sediments in the northeastern and southwestern parts of the Sea of Marmara: Strait and canyon regimes of the Dardanelles and Bosphorus. **Marine Geology**, v.96, p.313-340, 1991. [https://doi.org/10.1016/0025-3227\(91\)90154-V](https://doi.org/10.1016/0025-3227(91)90154-V)
- [30] NAVARRO, D.A., RICCI, A.M., RODRÍGUES, M.C. et al. Xylogalactans from *Lithothamnion heterocladum*, a crustose member of the Corallinales (Rhodophyta). **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p.944-951, 2011. [doi: 10.1016/j.carbpol.2010.12.048](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.048)
- [31] ZHU, Y.S., CONNOLLY, A., GUYON, A. et al. Solubilisation of calcium and magnesium from the marine red algae *Lithothamnion calcareum*. **International Journal of Food Science and Technology**, v.49, p.1600-1606, 2014. [doi:10.1111/ijfs.12459](https://doi.org/10.1111/ijfs.12459)
- [32] VENEU, D.M.; YOKOYAMA, L.; CUNHA, O.G.C. et al. Nickel sorption using Bioclastic Granules as a sorbent material: equilibrium, kinetic and characterization studies. **J Mater Res Technol.** pages 13, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2018.05.020> 2238-7854
- [33] BASSO, D.; TOMASELLI, V. Palaeoecological potentiality of rhodoliths: a Mediterranean case history. In: Matteucci R, Carboni MG, Pignatti JS (eds) Studies on ecology and paleoecology of benthic communities. **Boll Soc Paleont Ital Spec**, v.2 p.7–27, 1994.
- [34] DIAS, G.T.M; VILLAÇA, R.C. Coralline algae depositional environments on the brazilian central–south-eastern shelf. **Journal of Coastal Research**, v. 28(1), p. 270-279, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.2112/11T-00003.1>
- [35] HENRIQUE, M.C.; BOAS, A.V.; RODRIGUEZ, R R. et al. New records of rhodolith-forming species (Corallinales, Rhodophyta) from deep water in Espírito Santo State, Brazil, **Helgol Mar Res**, v.66, p. 219–231, 2012. [DOI 10.1007/s10152-011-0264-1](https://doi.org/10.1007/s10152-011-0264-1)

- [36] BOYD, W. E. Fossil *Lithothamnium* (calcareous algae) rhodoliths from Late Quaternary raised coastal sediments, Irvine, Ayrshire. **Scottish Journal of Geology**, v.22 (2), p.165-177, 1986. [DOI: 10.1144/sjg22020165](https://doi.org/10.1144/sjg22020165)
- [37] QUEIROZ, E.V.; ARAÚJO, P.V.N.; HAMMILL, E. et al. Morphological characteristics of rhodolith and correlations with associated sediment in a sandstone reef: Northeast Brazil. **Regional Studies in Marine Science**, v.8, p.133-140, 2016. [DOI: 10.1016/j.rsma.2016.10.005](https://doi.org/10.1016/j.rsma.2016.10.005)
- [38] AMADO-FILHO, G.M; MOURA, R.L.; BASTOS, A.C. et al., Rhodolith beds are major CaCO₃ bio-factories in the tropical south west Atlantic. **PLoS ONE**. v. 7 (4), p.1-6, 2012. [doi:10.1371/journal.pone.0035171](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035171)
- [39] WOELKERLING, W. J. A taxonomic reassessment of *Lithophyllum* (Corallinaceae, Rhodophyta) based on studies of R. A. **Br. phycol J.** v. 18, p. 299-328, 1983. <https://doi.org/10.1080/00071618300650211>
- [40] VILAIN, J. Improvements relating to seaweed-derived preparations. Depositante: Keith W. Nash & CO. **WO1992011020A1**. Depósito: 17 dez. 1991. Concessão: 9 jul. 1992. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/WO1992011020A1/en>>. Acesso em 05 de dezembro de 2020.
- [41] MENDES, C. M. Process for producing a marine mineral concentrate made from *Lithothamnium* seaweed, and the marine mineral concentrate obtained therefrom. Depositante: PHOSTHER ALGAMAR Ltda. **US20130266655A1**. Depósito: 9 abr. 2012. Concessão: 10 out. 2013. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US20130266655A1/en>>. Acesso em: 28/11/2020
- [42] ARESCHOUG, J. E. Corallineae. In: Species genera et ordines algarum. Volumen secundum: algas florideas complectens. (Agardh, J.G. Eds), Ordo XII, p. 506-576, 1852.
- [43] FOSTER, M. Rhodoliths: between rocks and soft places. **J. Phycol.** v. 37, p. 659–667, 2001. [doi: 10.1046 / j.1529-8817.2001.00195.x](https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.00195.x)
- [44] NASH, M.C.; DIAZ-PULIDO, G.; HARVEY, A.S. et al. Coralline algal calcification: A morphological and process-based understanding. **PLOS ONE**, September 26, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221396>

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- [45] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Trace elements in human nutrition and health. Geneva, 1996.
- [46] MEHRI A. Trace elements in human nutrition (II) – An update. **Int J Prev Med.**, v. 11: 2, p. 1-17, 2020. [DOI:10.4103/ijpvm.IJPVM_48_19](https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_48_19)
- [47] Dietary Reference Values for nutrients Summary report. **EFSA Supporting Publications**, 14(12), 2017. doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.e15121
- [48] COMBS JR, G. F. Geological Impacts on Nutrition. In: Selinus O. (eds) Essentials of Medical Geology. Springer, p. 179-194, 2013. [DOI 10.1007/978-94-007-4375-5_8](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4375-5_8)
- [49] SKALNAYA, M. G.; SKALNY, A. V. Essential trace elements in human health: a physician's view, – Tomsk: Publishing House of Tomsk State University, 2018. 224 p. (livro)
- [50] SOARES, C. M. Estudo químico da alga *Lithothamnion calcareum* e avaliação da atividade inibitória do rolamento de leucócitos, 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2009.
- [51] BETO, J. A. The Role of Calcium in Human Aging: review article. **Clin Nutr Res** v. 4, p.1-8, 2015. <http://dx.doi.org/10.7762/cnr.2015.4.1.1>
- [52] FISCHER, V.; HAFFNER-LUNTZER, M.; AMLING, M. et al. Calcium and vitamin d in bone fracture healing and post-traumatic bone turnover. **European Cells and Materials**, vol. 35, p. 365-385, 2018. [DOI: 10.22203/eCM.v035a25](https://doi.org/10.22203/eCM.v035a25)
- [53] VENKATESAN, J.; KIM, S. Osteoporosis Treatment: Marine Algal Compounds. Cap. 32. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 64, p. 417-427, 2011. [DOI: 10.1016/B978-0-12-387669-0.00032-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387669-0.00032-6)
- [54] TRAILOKYA, A.; SRIVASTAVA, A.; BHOLE, M. et al. Calcium and Calcium Salts. **Journal of The Association of Physicians of India**. v. 65, p.100-103, 2017.
- [55] MORTENSEN, L.; CHARLES, P. Bioavailability of calcium supplements and the effect of vitamin D: comparisons between milk, calcium carbonate, and calcium carbonate plus vitamin D. **J Clin Nutr.** v. 63, p. 354-357, 1996. [DOI: 10.1093/ajcn/63.3.354](https://doi.org/10.1093/ajcn/63.3.354)

- [56] PREMAOR, M.O.; FURLANETTO, T.W. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 50, nº 1, p. 25-37, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302006000100005>
- [57] HARVEY, N.C; BIVER, E.; KAUFMAN; J.M. et al. The role of calcium supplementation in healthy musculoskeletal ageing: An expert consensus meeting of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO) and the International Foundation for Osteoporosis (IOF). **Osteoporos Int.**, v. 28 (2), p. 447–462, 2017. DOI: [10.1007/s00198-016-3773-6](https://doi.org/10.1007/s00198-016-3773-6)
- [58] CHEVALLEY, T., RIZZOLI, R., NYDEGGER, V. et al. Effects of Calcium Supplements on Femoral Bone Mineral Density and Vertebral Fracture Rate in Vitamin-D-Replete Elderly Patients. **Osteoporosis Int**, v. 4, p. 245-252, 1994. <https://doi.org/10.1007/BF01623348>
- [59] DAWSON-HUGHES, B.; HARRIS, S.S; KRALL, E.A. et al. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. **The N Engl J Med.**, v. 337(10), p. 670-676, 1997 Sep. doi: [10.1056/NEJM199709043371003](https://doi.org/10.1056/NEJM199709043371003).
- [60] PEACOCK, M.; LIU, G.; CAREY, M. et al. Effect of Calcium or 25OH Vitamin D₃ Dietary Supplementation on Bone Loss at the Hip in Men and Women over the Age of 60. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 85 (9), p. 3011-3019, 2000. doi: [10.1210/jcem.85.9.6836](https://doi.org/10.1210/jcem.85.9.6836)
- [61] TADDEI, S.R.A.; MADEIRA, M.F.M., LIMA, I.L.A. et al. Effect of *Lithothamnium* sp and calcium supplements in strain- and infection-induced bone resorption. **Angle Orthodontist**, p. 1-9, 2014. DOI: [10.2319/080313-579.1](https://doi.org/10.2319/080313-579.1)
- [62] BROWN, E.M.; Allsopp, P., Magee, P.J. et al. Seaweed and human health. **Nutrition Reviews**, v. 72, Issue 3, p. 205–216, 1 March 2014, <https://doi.org/10.1111/nure.12091>
- [63] AQUAMIN. Marine Minerals for Health. Disponível em: <<https://aquamin.com/marine-minerals/>>. Acesso em: 08 de janeiro de 2021.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- [64] PERALI, C.; MAGNOLI, A.P; ARONOVICH, M. et al. *Lithothamnium calcareum* (Pallas) Areschoug seaweed adsorbs aflatoxin B1 in vitro and improves broiler chicken's performance. **Mycotoxin Research**, v. 36, p. 371–379, 2020.
<https://doi.org/10.1007/s12550-020-00402-y>
- [65] STOKES, R.S; VAN EMON, M.L; LOY, D.D. Assessment of algae meal as a ruminant feedstuff: Nutrient digestibility in sheep as a model species. **J. Anim. Sci.**, v. 93, p. 5386–5394, 2015. [doi:10.2527/jas2015-9583](https://doi.org/10.2527/jas2015-9583)
- [66] WU, Z.; BERNARD, J. K.; TAYLORT, S. J. Effect of feeding calcareous marine algae to Holstein cows prepartum or postpartum on serum metabolites and performance. **J. Dairy Sci.**, v. 98, p. 4629-4639, 2015.
<https://doi.org/10.3168/jds.2014-8711>
- [67] NEVILLE, E.W.; FAHEY, A.G.; GATH, V.P. et al. The effect of calcareous marine algae, with or without marine magnesium oxide, and sodium bicarbonate on rumen pH and milk production in mid-lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.102(9), 13p., 2019. [doi:10.3168/jds.2019-16244](https://doi.org/10.3168/jds.2019-16244)
- [68] CARVALHO, R.F.; MAZONI, M.R.; SILVA, A.P.S. Use of calcareous algae and monensin in Nellore cattle subjected to an abrupt change in diet. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.4, p.713-718, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150278>
- [69] CARLOS, A.C.; SAKOMURA, N.K.; PINHEIRO, S.R. F. Use of algae *Lithothamnium calcareum* as alternative source of calcium in diets for broiler chickens. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 35, n. 4, p. 833-839, 2011.
- [70] SCHLEGEL, P.; GUTZWILLER, A. Effect of dietary calcium level and source on mineral utilisation by piglets fed diets containing exogenous phytase. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, p. 1-10, 2016. [DOI: 10.1111/jpn.12582](https://doi.org/10.1111/jpn.12582)
- [71] MELO, T.V.; MOURA, A.M.A. Use of seaweed flour in the animal feeding. **Arch. Zootec.** v. 58, p. 99-107, 2009.
- [72] RIOSMENA-RODRIGUEZ, R. WENDY, N., W., AGUIRRE, J. Natural History of Rhodolith/Maërl Beds: Their Role in Near-Shore Biodiversity and Management, [Coastal Research Library] Rhodolith/Maërl Beds: A Global Perspective, v.15, p.3-26.
[DOI 10.1007/978-3-319-29315-8_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-29315-8_1)

- [73] GONDIM, A.I., DIAS, T.L.P., DUARTE, R.C.S. et al. Filling a knowledge gap on the biodiversity of rhodolith-associated Echinodermata from northeastern Brazil. **Tropical Conservation Science**, v.7 (1), p.87-99, 2014. [DOI: 10.1177/194008291400700112](https://doi.org/10.1177/194008291400700112)
- [74] GRALL, J., HALL-SPENCER, J.M. Problems facing maërl conservation in Brittany. **Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.** 13, p.S55–S64, 2003. [DOI: 10.1002/aqc.568](https://doi.org/10.1002/aqc.568)
- [75] HALL-SPENCER, J.M., GRALL, P.G., ATKINSON, R.J.A. Bivalve fishing and maerl-bed conservation in France and the UK - retrospect and prospect. **Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.** V.13, p. S33–S41, 2003. [DOI: 10.1002/aqc.566](https://doi.org/10.1002/aqc.566)

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

CAPÍTULO II

Caracterização física e química de carbonato de cálcio proveniente da alga marinha *Lithothamnium calcareum*, potencial princípio ativo em suplementos alimentares

CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DE CARBONATO DE CÁLCIO PROVENIENTE DA ALGA MARINHA *LITHOTHAMNIUM CALCAREUM*, POTENCIAL PRINCÍPIO ATIVO EM SUPLEMENTOS ALIMENTARES

RESUMO

O carbonato de cálcio é amplamente utilizado como suplemento alimentar na prevenção da osteoporose, sendo comumente administrado na forma de comprimidos. O carbonato de cálcio proveniente da alga marinha *Lithothamnium calcareum* foi caracterizado no presente estudo a partir de análises químicas, físicas e mineralógicas. Dessa forma, foi demonstrado que há diferenças no carbonato de cálcio em função de sua origem (*Lithothamnium calcareum*, carbonato de cálcio mineral e carbonato de cálcio de ostra), quanto ao tamanho de poros, aos dados de isótopos estáveis e de variedades polimórficas.

Palavras-chave: caracterização físico-química, caracterização de *Lithothamnium*, carbonato de cálcio, *Lithothamnium calcareum*

1. INTRODUÇÃO

O carbonato de cálcio (CaCO_3) é um mineral largamente distribuído na natureza e uma das matérias-primas mais utilizadas para fins comerciais, podendo ser empregado em agriculturas, nas indústrias alimentícias, de cosméticos, farmacêuticas, entre outras.^{1, 2} O CaCO_3 é um importante suplemento alimentar para prevenção da osteoporose,^{3, 4} uma doença ósseo-metabólica de distribuição global, caracterizada por uma resistência baixa do osso, que leva à fragilidade e ao risco de fraturas.^{5, 6}

A forma mais comum de administração de cálcio são comprimidos, cujo desempenho depende de formulação adequada e que também são muito dependentes das características físicas e químicas do princípio ativo. Em geral, qualquer que seja a forma farmacêutica de um princípio ativo, sendo ele presente em quantidades baixas ou elevadas, as propriedades físicas e químicas devem ser estudadas.⁷

Lithothamnium calcareum (*L. calcareum*) é uma alga marinha da família *Corallinacea*, de coloração típica avermelhada, encontrada mais abundantemente nos mares europeus. Uma característica do *L. calcareum* é a cristalização de carbonato de cálcio em suas paredes celulares.^{8, 9, 10} O CaCO_3 proveniente de *L. calcareum* contém oligoelementos em quantidades variáveis, tornando-o valioso para uso na suplementação alimentar.^{9, 11}

Diversas fontes de cálcio também são empregadas para uso humano, especialmente na suplementação alimentar, como por exemplo o CaCO_3 mineral que é amplamente utilizado nas indústrias, não somente como insumo principal, como também excipiente¹² e o CaCO_3 de ostra, que assim como o *L. calcareum*, são considerados sedimentos abundantes nos oceanos, principalmente nos mares quentes, com climas tropicais e também subtropicais.^{1, 2}

A literatura acerca da caracterização físico-química de *L. calcareum* é escassa. Os trabalhos encontrados estão focados na composição química, especialmente no que se refere à composição dos oligoelementos.^{11, 13, 14} Aspectos como polimorfismo, morfologia e variações composicionais em escala microscópica, área superficial e

porosidade são parâmetros fundamentais no contexto da produção de comprimidos. Porém, na literatura científica não foi encontrado um estudo de caracterização que engloba todos esses aspectos, indicando uma lacuna para a utilização em escala industrial farmacêutica desse material.¹⁵

O objetivo deste estudo foi caracterizar o CaCO_3 proveniente da alga marinha *L. calcareum*, em suas propriedades físicas, químicas, mineralógicas e isotópicas (carbono e oxigênio), comparando-o com CaCO_3 mineral e de ostra, também aplicados para suplementação de cálcio. Esta caracterização visa fornecer subsídios ao aproveitamento deste insumo em escala industrial, bem como permitir que suas características intrínsecas sejam utilizadas na rastreabilidade do material.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Nesse estudo foram selecionadas amostras de carbonato de cálcio proveniente da alga marinha *Lithothamnium calcareum* (Lithocálcio Indústria, Comércio, Importação, Exportação e Representação Ltda, Brasil), carbonato de cálcio de origem mineral (Valdequímica Produtos Químicos Ltda, Brasil) e carbonato de cálcio de ostra (Opção Fênix Distribuidora de Insumos Ltda, Brasil).

2.2 Avaliação do fluxo dos pós

O fluxo das amostras em pó foi analisado pela determinação dos parâmetros densidade aparente, densidade compactada, índice de compressibilidade (IC) e razão de Hausner (RH).

A densidade aparente das amostras foi medida e transferida cada massa para uma proveta de 100 mL até atingir o volume de 50 mL. Posteriormente, foi registrado o peso em balança semi-analítica e em seguida, o material foi transferido para uma proveta padronizada em densímetro "Tap Density" (Ethik, São Paulo, Brasil). Foi determinado a densidade compactada (d_c) conforme descrito na Farmacopeia Americana.¹⁶ A partir dos dados obtidos, foram calculados os valores de densidade aparente e compactada segundo as equações:

$$d_{ap} = M_i/V_i \quad (\text{Eq. 1})$$

$$d_{cp} = M_i/V_f \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que:

d_{ap} = densidade aparente (g/cm³)

M_i = massa inicial (g)

V_i = volume inicial (cm³)

d_{cp} = densidade compactada (g/cm³)

V_f = volume final (cm³)

O cálculo do índice de compressibilidade (IC) e razão de Hausner (RH) foi realizado por meio dos valores obtidos de densidade aparente (d_{ap}) e compactada (d_{cp}), utilizando as seguintes equações:

$$\text{IC (\%)} = \frac{d_{cp} - d_{ap}}{d_{cp}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\text{RH} = \frac{d_{cp}}{d_{ap}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

IC = índice de compressibilidade

RH = Razão de Hausner

d_{cp} = densidade compactada

d_{ap} = densidade aparente

2.3 Área superficial e porosidade

Na análise da área superficial e porosidade das amostras de CaCO₃ foi empregado um analisador de adsorção gasosa NOVA 2200e (Quantachrome Corporation, Flórida, EUA). Previamente, as amostras foram dessecadas a 90°C e em seguida submetidas ao ensaio com temperatura do equipamento entre 0°C e -196°C. Foi empregado o método Brunauer-Emmelt-Teller (BET) descrito por Lowell e colaboradores¹⁷ e Klobes e colaboradores¹⁸, conforme as equações descritas a

seguir. Os parâmetros foram programados em isotermas a partir de 52 pontos (31 pontos de adsorção e 21 pontos de dessorção de gás nitrogênio ultrapuro). Foram estabelecidos as pressões relativas (p/p^0) entre 0,05 e 0,95⁰ e o tempo de análise variou de 3 a 8 horas.

Método BET:

$$\frac{p/p^0}{n(1-p/p^0)} = \frac{1}{n_m C} + \frac{C-1}{n_m C} (p/p^0) \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde:

n : quantidade adsorvida na pressão relativa

n_m : capacidade específica da monocamada

C : constante relativa a adsorção da primeira monocamada

p/p^0 : pressão relativa

Área superficial:

$$A_{(BET)} = n_m \cdot L \cdot a_m \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde:

$A_{(BET)}$: área BET

L : constante Avogadro

Porosidade:

$$\ln P/P_0 = \frac{-2\gamma\bar{V}}{rRT} \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde:

r : tensão superficial do líquido

\bar{V} : volume molar do líquido condensado contido em um poro estreito de raio r

R : constante do gás

T : temperatura

2.4 Análise térmica

A análise térmica das amostras foi analisada por termogravimetria (TG), termogravimetria derivada (DTG) e análise térmica diferencial (DTA). Foi empregado um equipamento Extar TG 7200 (Seiko Instruments, Toquio, Japão). Os parâmetros selecionados foram: atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás (100 mL min^{-1}), razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ e temperatura de 30 até 1000°C , em cadinho de platina. Ainda, o equipamento foi calibrado previamente com padrão de oxalato de cálcio, com a mesma taxa de aquecimento e intervalo de temperatura utilizados nas amostras.

2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A morfologia das amostras de CaCO_3 foi analisada no Laboratório de Caracterização Tecnológica (Escola Politécnica da Universidade de São Paulo), em microscópio eletrônico de varredura ambiental Quanta 650 FEG (FEI), equipado com sistemas de microanálise por EDS Quantax (Bruker, Massachusetts, EUA) e de análises de imagens (MLA- Mineral), Detector x Flash 4030 com tecnologia SDD (silicon drift detector). Foram selecionados parâmetros instrumentais como: janela de 30 mm^2 , resoluções de $<130 \text{ eV}$ (Mn $K\alpha$) a 60 kcps, 138 eV a 130 kcps e 158 eV a 280 kcps.

2.6 Difração de raios-X

A análise por difração de raios-X (método do pó) das amostras foi realizada na Central Multiusuários Geoanalítica (Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo), em difratômetro Bruker D8 Advance com detector LYNXEYE (Bruker, Massachusetts, EUA). Os parâmetros instrumentais selecionados foram: radiação Cu K-alfa, corrente de 40 mA, voltagem de 40 kV, intervalo angular de 2 a 65 graus (2 teta), passo angular de 0,02 graus (2 teta) e velocidade angular de 38,4 segundos por passo.

Os polimorfos foram identificados com base nos software High Score Plus 3.0 (Panalytical B.V., Holanda) e banco de dados COD (Crystallography Open

Database).¹⁹ A análise quantitativa de fases em amostras polifásicas foi realizada pelo método de Rietveld,²⁰ no programa High Score Plus 3.0 (Panalytical B.V., Holanda).

2.7 Análise de componentes principais

Os resultados de caracterização das amostras de CaCO₃ foram comparados entre si através de análise multivariada e Análise de Componentes Principais (ACP), software Statistica™ Inc. 13.5.0.17 (TIBCO® Software Inc., Tulsa, Estados Unidos). Como variáveis originais foram adotados o fluxo do pó (IC%), as informações obtidas na análise de área superficial pelo método BET (área superficial específica, tamanho e volume de poro), as informações obtidas na análise térmica (ponto de fusão (°C) e perda de massa (%)), tamanho das partículas obtidas pelo MEV e polimorfismo. Após a padronização dos dados, foi criado dois componentes principais, o ACP1 e ACP2 e utilizados na construção dos gráficos bidimensionais.

2.8 Análises químicas

As análises químicas de elementos traços foram conduzidas na Central Multiusuário Geoanalítica (Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo), em equipamento ICP-MS ELAN 6100 DRC™ (PerkinElmer®, Massachusetts, EUA), conforme procedimentos descritos em Navarro e colaboradores.²¹

2.9 Análise de isótopos estáveis

Os isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) foram analisados no Centro de Pesquisas em Geocronologia e Geoquímica Isotópica (Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo), em espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS) ThermoFischer Scientific™ (Delta V, Massachusetts, EUA). Os dados isotópicos são apresentados na notação delta (δ), expresso em per mil (‰), que relaciona as razões isotópica da amostra com a de padrões internacionais de referência, conforme apresentado nas equações a seguir. A precisão dos resultados de $\delta^{13}\text{C}$ é de 0,05‰ e de $\delta^{18}\text{O}$ é de 0,07‰.

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{V-PDB}} = \frac{{}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{\text{amostra}} - {}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{\text{V-PDB}}}{{}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{\text{V-PDB}}} \times 1000 \quad (\text{Eq. 8})$$

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}} = \frac{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{amostra}} - {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{V-PDB}}}{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{V-PDB}}} \times 1000 \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde:

${}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{\text{amostra}}$ e ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{amostra}}$: são as razões isotópicas das amostras

${}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}_{\text{V-PDB}}$ e ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{V-PDB}}$: são as razões isotópicas do padrão internacional Vienna Pee Dee Belemnite

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para *L. calcareum* mostraram o IC e RH inferiores em relação às outras amostras, sendo que todas as amostras analisadas possuem características de fluxo não ideais (Tabela 2.1). Como consequência disso, o processamento do material é dificultado, uma vez que o escoamento irregular na máquina de comprimir pode impactar significativamente o produto final. Isso contribui para uma variabilidade de peso e influencia na qualidade dos comprimidos. Tendo em vista este comportamento, é mais adequado utilizar o processo de granulação úmida para obter comprimidos de CaCO_3 , seja qual for sua fonte.^{22, 23}

O fluxo de partículas de CaCO_3 pode ser, pelo menos em parte, comprometido pela clivagem típica dos cristais, que tendem a formar partículas de forma anisotrópica (romboédrica), que desviam da forma esférica.²⁴

Tabela 2.1 – Propriedades de fluxos das amostras de CaCO₃: densidade aparente, densidade compactada, índice de compressibilidade e razão de Hausner de *L. calcareum*, CaCO₃ mineral e CaCO₃ de ostra.

Amostras	Densidade aparente (gmL⁻¹)	Densidade compactada (gmL⁻¹)	Índice de compressibilidade (%)	Razão de Hausner
<i>L. calcareum</i>	0,49	0,80	38,75	1,63
CaCO ₃ mineral	0,30	0,53	43,40	1,77
CaCO ₃ ostra	0,74	1,32	43,94	1,78

A fluidez das amostras de CaCO₃ pode influenciar nos resultados de área superficial e porosidade. A diminuição do tamanho dos poros de *L. calcareum* e CaCO₃ de ostra está relacionado ao aumento da densidade compactada do material (Tabela 2.2), e isso pode implicar em fragilidade do comprimido, como comprimidos quebradiços e lascados em escala de produção.²⁴

Em se tratando de porosidade, o *L. calcareum* mostrou características de um material ultramicroporoso, com tamanho de poro <7 Å. A forma exibida na literatura para essa classificação é fenda ou enrolada, que corroborou com o resultado apresentado na Figura 2.1, que caracteriza uma histerese do tipo H3.²⁵ Um loop de histerese significa que a curva de dessorção não é simultânea à curva de adsorção. O formato H3 significa agregados não-rígidos de partículas e está relacionado à condensação capilar dos sólidos porosos.²⁶ A amostra de CaCO₃ mineral demonstrou tendência para o formato de histerese do tipo H3 enquanto para CaCO₃ de ostra não identificamos histerese característica.

A classificação de materiais microporosos, é dado de acordo com a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), que considera materiais com poros entre 7-20 Å como microporosos e <7 Å, ultramicroporosos.²⁷ O CaCO₃ de ostra tem a mesma classificação que o *L. calcareum*, enquanto o CaCO₃ mineral é microporoso.

Tabela 2.2 – Área superficial, volume e tamanho do poro das amostras de *L. calcareum*, CaCO₃ mineral e CaCO₃ de ostra.

Amostras	A _(BET) (m ² .g ⁻¹)	V _p (x10 ⁻³ cm ³ .g ⁻¹)	Tamanho do poro (Å)
<i>L. calcareum</i>	8,118	1,585	3,906
CaCO ₃ mineral	7,857	3,829	9,746
CaCO ₃ ostra	2,935	5,081	3,463

Um material ultramicroporoso e microporoso, dá origem a uma isoterma do tipo III, que é quando não se determina o ponto B na pressão relativa (p/p^0). Nesse caso, as três amostras são do tipo III, e é conhecido que as moléculas de gás têm maior afinidade uma pelas outras e isso significa que não são isotermas comuns.¹⁷ Extraímos dados da reta de coeficiente angular de *L. calcareum* em que o valor da constante (C) obtido foi de 75,065, ou seja, uma característica de molécula do adsorvato com interação significativa entre si. O coeficiente linear para essa amostra foi igual a 0,999952. Considerando que as amostras de CaCO₃ mineral e CaCO₃ de ostra mostraram coeficiente linear igual a 0,999989 e 0,998042, respectivamente, a C assumiu comportamento distintos entre elas, quando o CaCO₃ mineral teve um valor de 52,281 e CaCO₃ de ostra de 15,925.

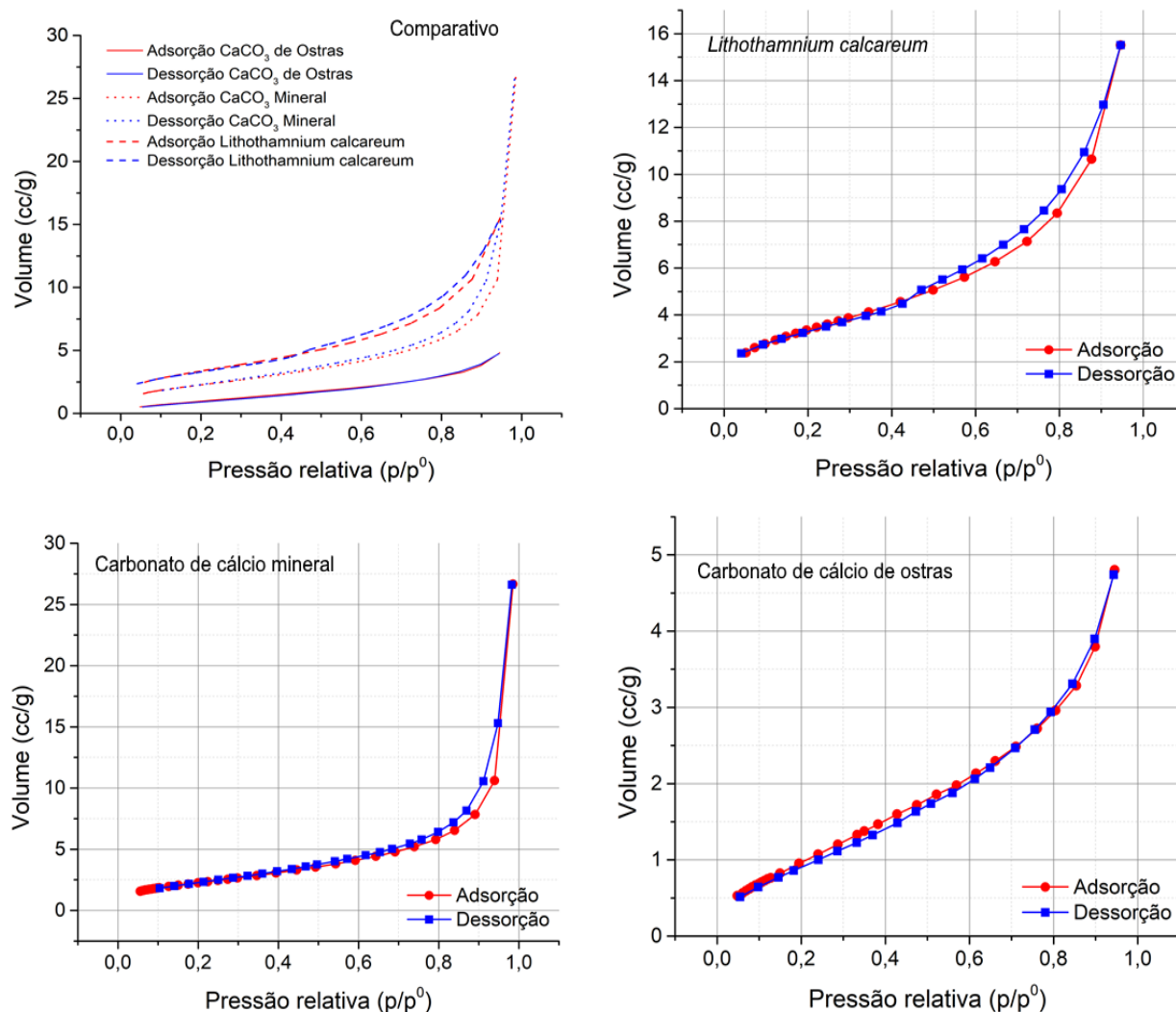
De modo geral, um material microporoso tem o mecanismo de enchimento dos poros com a adsorção sendo preenchida em instante,²⁵ e este comportamento ocorreu somente nas amostras de *L. calcareum* e CaCO₃ de ostra que exibiram perfis semelhantes como demonstramos no gráfico volume *versus* p/p^0 (Figura 2.1).

L. calcareum apresentou elevada área superficial e, em consequência disso, um menor volume de poros, além de exibir isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio similares e próximas àquelas observadas por Xia e colaboradores,²⁸ com amostras de CaCO₃.

Em relação à amostra de CaCO₃ mineral, os valores da área superficial, o menor volume de poros e as isotermas de adsorção e dessorção são semelhantes àquelas

obtidas para *L. calcaireum*, enquanto para CaCO_3 de ostra os valores identificados não foram similares. O CaCO_3 mineral demonstrou uma adsorção maior do material decorrente do maior tamanho de poros, se comparado com as outras amostras.

Figura 2.1: Perfis de isotermas tipo III de adsorção e dessorção das amostras. O primeiro gráfico representa os perfis comparativos das amostras de CaCO_3 conforme as escalas.



Na termogravimetria de *L. calcaireum*, o que se observa no perfil é um processo de decomposição em $670,9\text{ }^\circ\text{C}$ (Tabela 2.3 e Figura 2.2), onde ocorreu a liberação de CO_2 . Além disso, o pico exotérmico de *L. calcaireum* apresentou semelhanças com outras amostras de carbonato de cálcio.²⁹ Este evento está em concordância com o

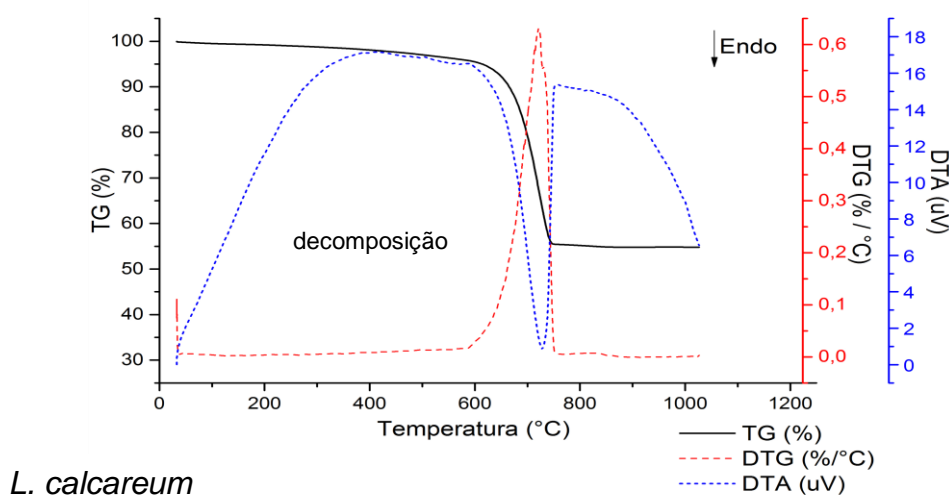
pico endotérmico identificado para DTA. Contudo, a partir desse evento, ocorreu a perda de massa de *L. calcareum*, sendo então, eventos semelhantes e próxima às analisadas e discutidas por Li e colaboradores.³⁰

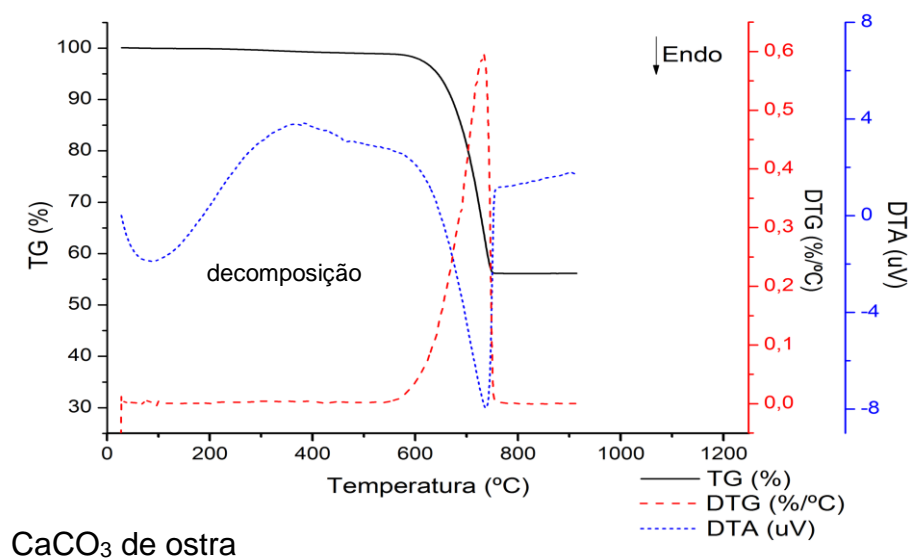
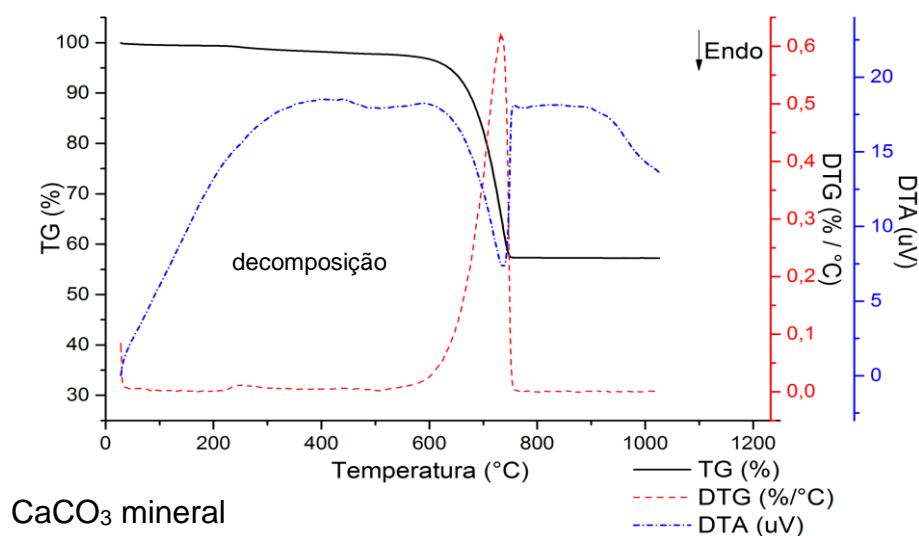
A amostra de CaCO_3 de ostra mostrou o processo de decomposição bastante elevado, se comparado com *L. calcareum*. Da mesma maneira, os valores de perda de massa e a característica do pico exotérmico se elevaram. Entretanto, avaliamos que quanto menor registrou a temperatura do processo de decomposição, menor a perda de massa obtida.

Tabela 2.3 – Resultados termoanalíticos para as amostras de CaCO_3 : *L. calcareum*, CaCO_3 mineral e CaCO_3 de ostra.

Amostras	Evento	T _{pico} DTG (°C)	T inicial (°C)	T onset (°C)	T final (°C)	Perda de massa (%)	T _{pico} DTA (°C)
<i>L. calcareum</i>	Decomposição	720,3	587,0	670,9	757,1	40,4	727,3
CaCO_3 mineral	Decomposição	731,9	572,0	668,9	760,3	39,9	736,8
CaCO_3 de ostra	Decomposição	734,9	693,1	675,1	751,0	42,7	737,5

Figura 2.2: Perfis TG e DTG das amostras de CaCO_3 : *L. calcareum*, CaCO_3 mineral e CaCO_3 de ostra.





Em *L. calcareum*, não identificamos estrutura morfológica definida na análise de MEV (Figura 2.3). No gráfico de EDS (Figura 2.3), identificamos os elementos conforme ordem de sua energia, sendo aquele apresentado do baixo número atômico para o mais elevado.³¹ Sendo assim, o teor de cálcio encontrado na composição de *L. calcareum* é 36,89%, e os resultados apontaram que parte dos elementos químicos presentes foram constituído por carbono, oxigênio e magnésio. Nesses gráficos, apenas os picos bem definidos foram identificados, inclusive aqueles com baixa intensidade, com fragmentos de outros elementos.

Para a amostra de CaCO_3 mineral (Figura 2.4), a estrutura se apresentou diferenciada em relação ao *L. calcareum*. Diante disso, o CaCO_3 mineral apresenta forma bem definida, com presença de cristais escalenoédricos.³² Os cristais escalenoédricos são estruturas comuns na morfologia de calcita, e sua precipitação pode ocorrer somente em pontos específicos e parâmetros bem definidos que são marcados pelos planos $[2\ 1\ 4]$.³³ Na escala das partículas, o CaCO_3 mineral apresentou um tamanho menor em relação ao *L. calcareum*. No gráfico de EDS (Figura 2.4), identificamos um teor de cálcio 39,06%, além dos elementos químicos carbono e oxigênio.

A estrutura morfológica de CaCO_3 de ostra (Figura 2.5) apresentou forma diferenciada das demais amostras, ou seja, o material em sua morfologia é heterogêneo e exibiu as menores partículas na escala de 1nm. Além do mais, no gráfico de EDS (Figura 2.5), destacou a amostra na mais elevada intensidade se comparada com *L. calcareum*. Contudo, os elementos químicos identificados no material são similares àqueles detectados em *L. calcareum* considerando o teor calculado para o CaCO_3 de ostra o mais elevado, com valor de 41,86%.

Figura 2.3: Imagens de elétrons secundários (MEV) e EDS da amostra da amostra de *L. calcareum*.

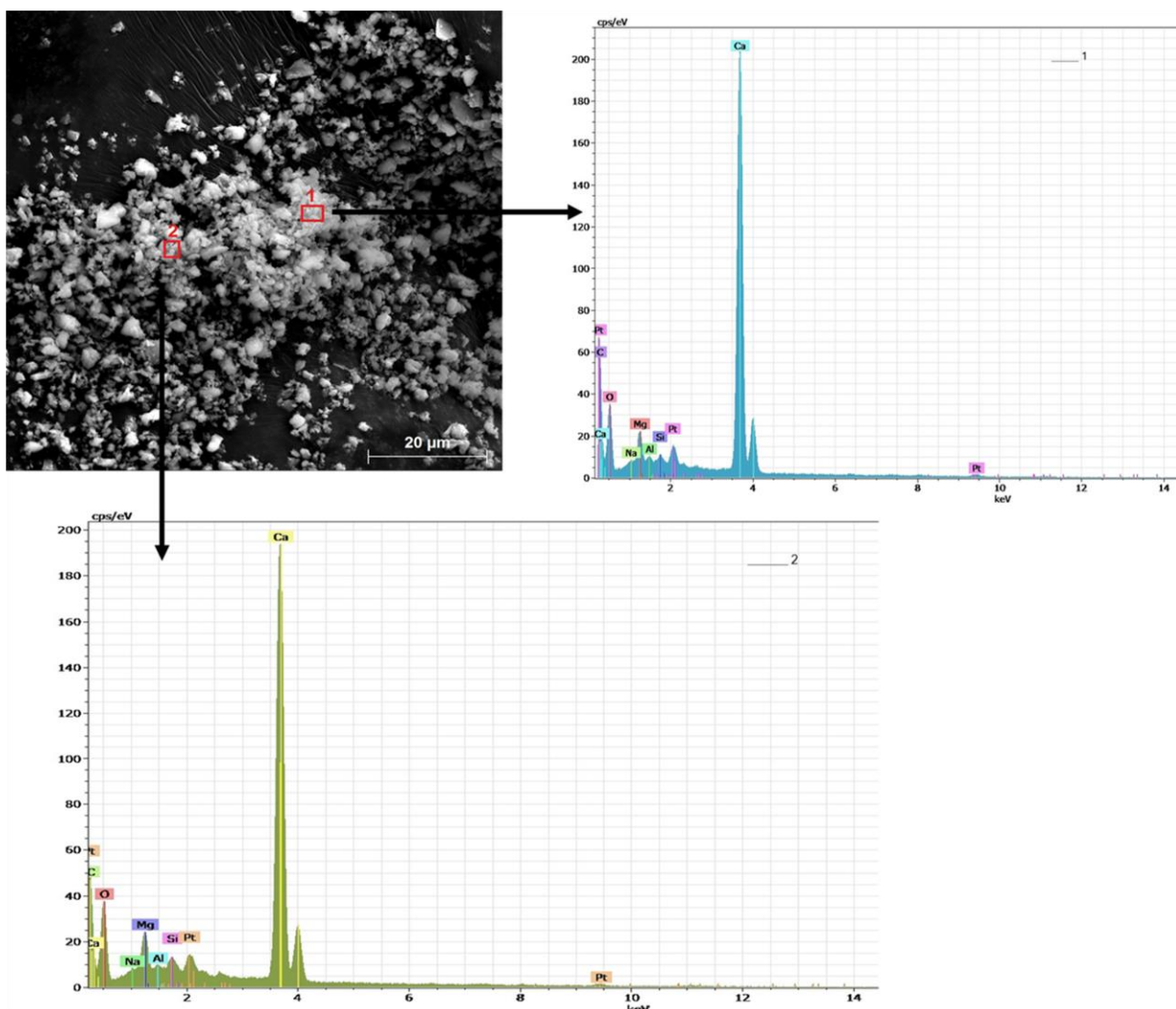
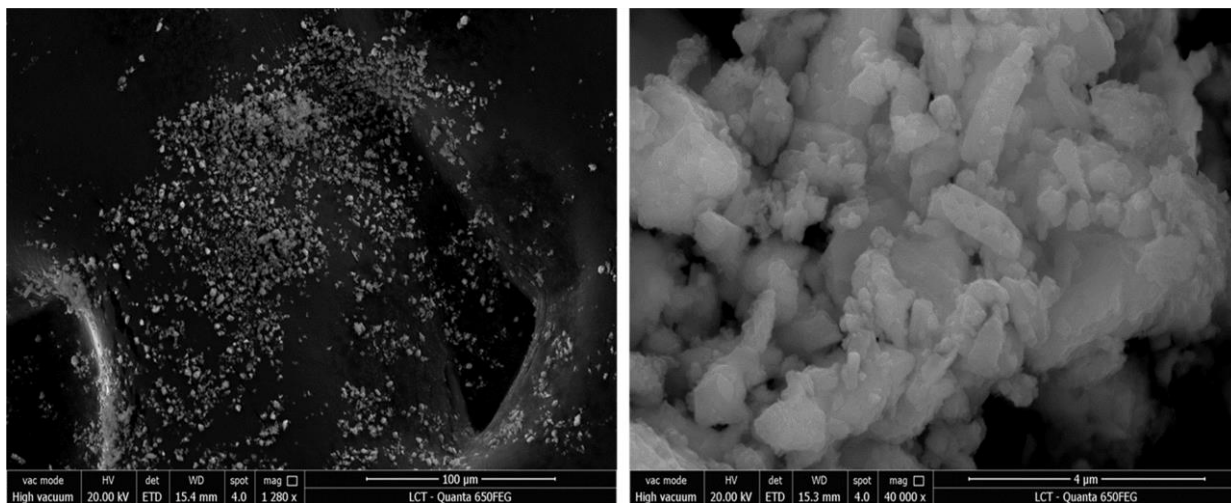


Figura 2.4: Imagens de elétrons secundários (MEV) e EDS da amostra de CaCO_3 mineral.

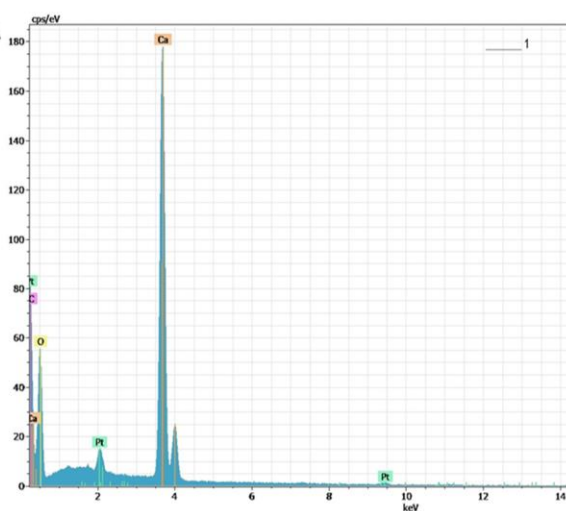
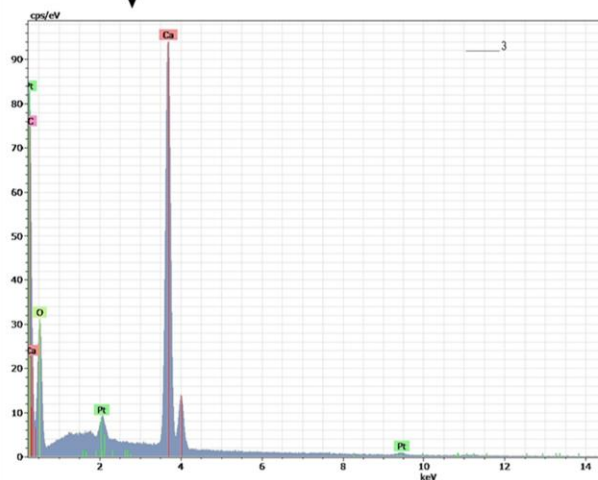
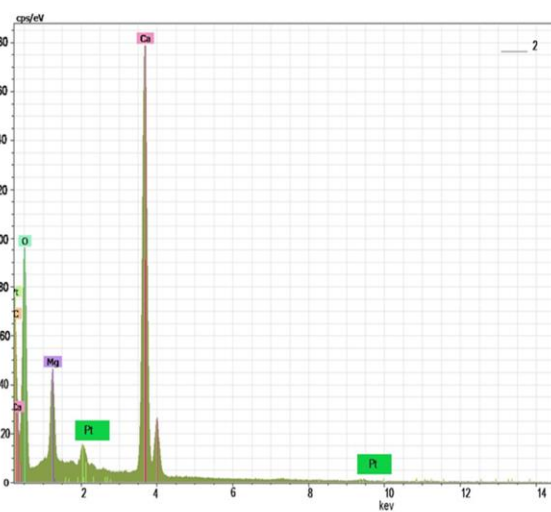
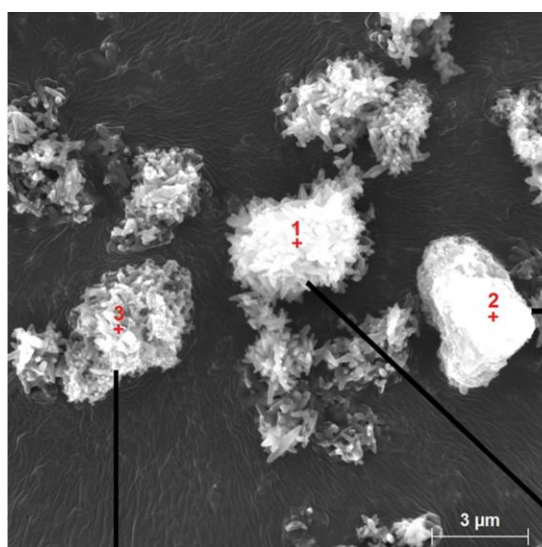
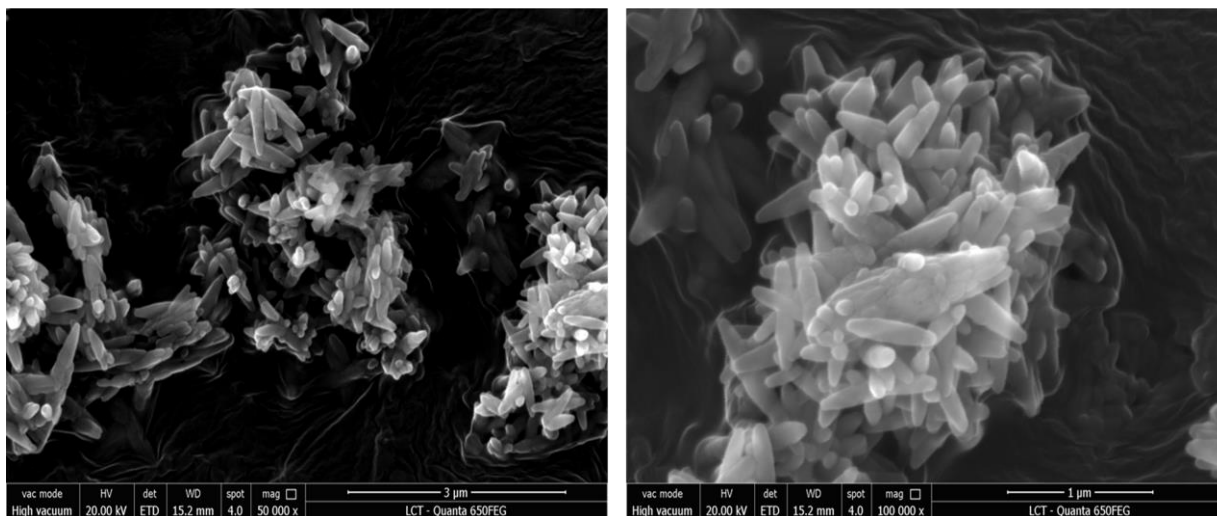
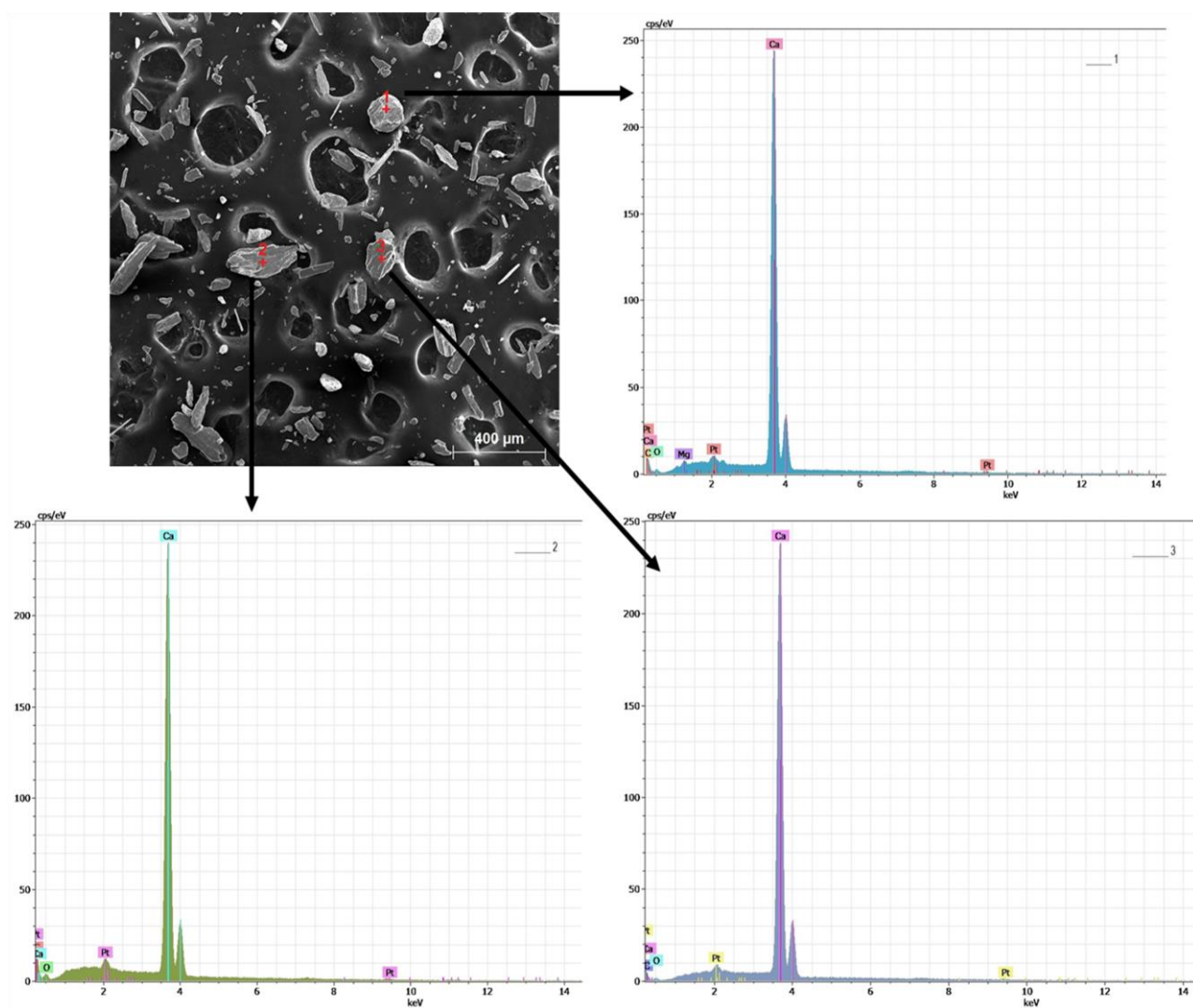
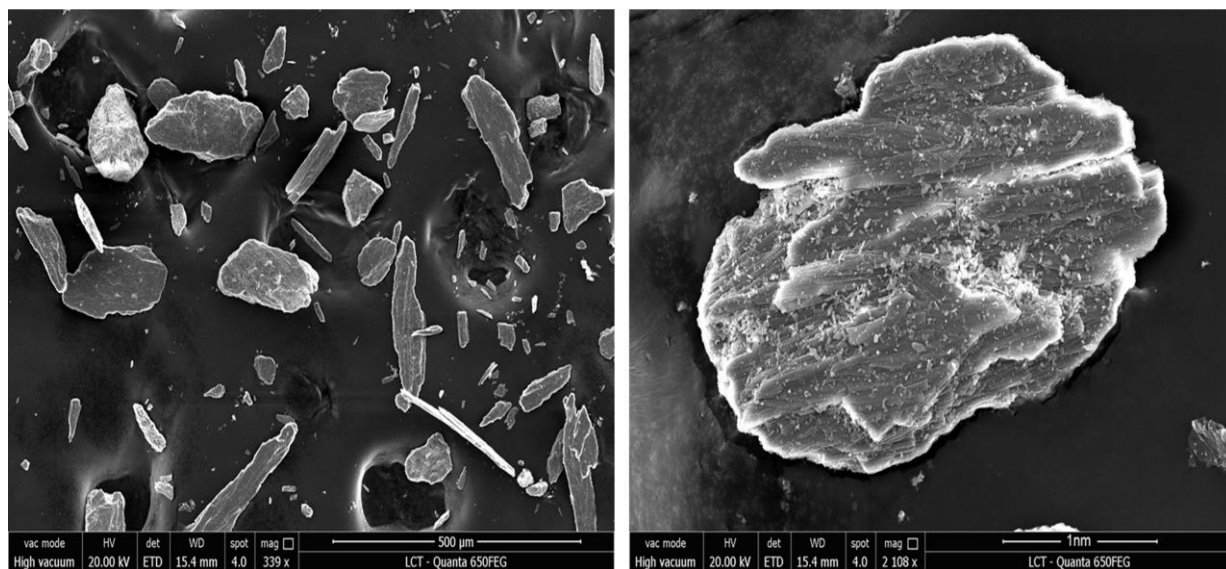
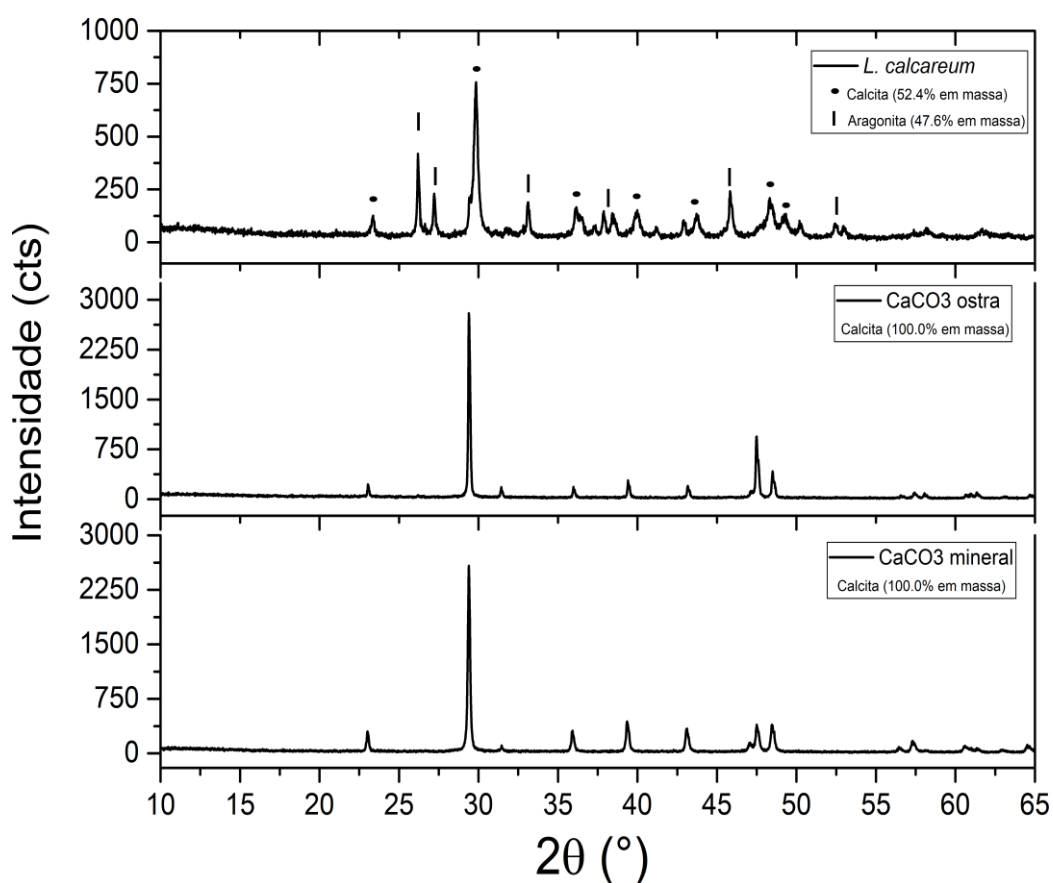


Figura 2.5: Imagens de elétrons secundários (MEV) e EDS da amostra de CaCO_3 de ostra.



Nos difratogramas (Figura 2.6) as fases polimórficas podem ser facilmente identificadas. A amostra de *L. calcareum* contém os polimorfos calcita e aragonita. Dependendo das condições de cristalização, os polimorfos podem apresentar hábito cristalino característico, como romboédrico no caso da calcita, acicular ou pseudo-hexagonal no caso da aragonita.^{12, 32, 34, 35} Entretanto, as amostras CaCO₃ mineral e CaCO₃ de ostra são monofásicas, compostas apenas por calcita.

Figura 2.6: Difratogramas de difração de raios-x das amostras de *L. calcareum*, CaCO₃ mineral e CaCO₃ de ostra pelo método de Rietveld.

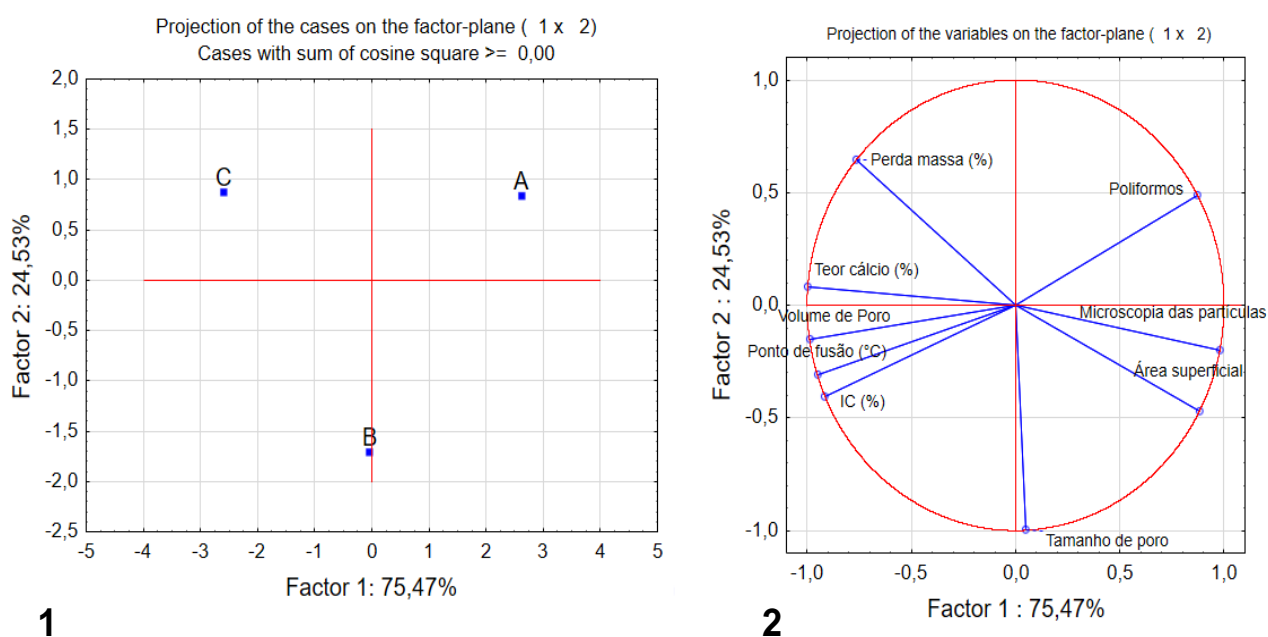


A partir dos resultados acima obtidos, construímos gráficos bidimensionais de componentes principais (Figura 2.7). Pela distribuição apresentada investigamos que as duas novas variáveis criadas de mesma dimensão (ACP1 e ACP2), foram capazes de reter 100% da informação contida nas variáveis originais. Verificamos ainda, que,

a ACP1 explicou mais de 70% da variabilidade dos dados enquanto a ACP2, 24,53%, que foi melhor definida apenas pela variável tamanho de poro.

Sendo assim, o *L. calcareum* (A) contribuiu mais para o fator 1, que abrangeu principalmente as variáveis polimorfos, tamanho das partículas e área superficial bem representadas, enquanto para a amostra CaCO₃ mineral (B) se destacou pela variável tamanho de poro. Na amostra de CaCO₃ de ostra (C), mostrou principalmente as variáveis teor de cálcio e perda de massa que também foi interpretada pelo fator 1 e, nesse caso, essa amostra é a que mais se distancia dos demais componentes, enquanto CaCO₃ mineral (B) registrou um grupo maior de variáveis. Sendo assim, discriminamos os 3 grupos e as amostras se diferenciaram em todas as variáveis, e aquelas que mais se destacaram se referem ao teor de cálcio e tamanho de poro que apresentaram valores acima de 0,99.

Figura 2.7: Gráficos de componentes principais: 1- distribuição das amostras *L. calcareum* (A), carbonato de cálcio mineral (B) carbonato de cálcio de ostras (C), conforme tendências observadas na análise multivariada e 2 - gráfico bidimensional de componentes principais. Ambos os Fatores 1 e 2 correspondem a 100% das informações contidas nas variáveis originais.



Na composição química das amostras de CaCO₃ (Tabela 2.4), os valores dos elementos Sc, Rb, Y, Zr, Nb, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Pb, Th e U são considerados baixos (<15 ppm), enquanto Sr (estrôncio) nas três amostras, apresentou teores entre 159,50 e 854,50 ppm.

A presença de oligoelementos é uma vantagem do ponto de vista da saúde humana, além da ausência de toxicidade.^{36, 37} As proporções dos elementos essenciais são adequadas para consumo humano, uma vez que quantidades <0,01% do peso corporal são necessários na dieta diária, com exceção dos elementos Al, Cr, Se, Cu, Mo, Pb entre outros. Nesses últimos citados, em quantidade elevadas são considerados tóxicos.³⁸

Um número elevado dos oligoelementos na amostra de *L. calcareum* foi identificado em relação as demais amostras, o que torna uma característica intrínseca, relacionada à procedência do material. O elemento Sr presente em todas as amostras, principalmente na amostra de CaCO₃ de ostra, não é fator restritivo, pois este elemento não consta na lista de elementos tóxicos da OMS.³⁹

Tabela 2.4 – Teores de elementos traços (ppm) das amostras (em duplicata) de *L. calcareum*, CaCO₃ mineral e CaCO₃ de ostra.

Elementos químicos	<i>L. calcareum</i>		CaCO ₃ mineral		CaCO ₃ de ostra	
Sc	0,50	0,49	0,07	0,07	0,03	0,03
Rb	0,87	0,91	0,33	0,33	0,11	0,11
Sr	291,0	307,8	158	161	868	842
Y	1,61	1,67	0,66	0,68	0,10	0,10
Zr	0,64	0,62	0,71	0,60	0,09	0,05
Nb	0,32	0,33	0,06	0,06	0,02	0,09
Cs	0,04	0,04	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Ba	6,63	6,54	14,2	15,80	<0,50	0,50
La	1,65	1,63	0,14	0,15	0,16	0,16
Ce	3,79	3,73	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Pr	0,35	0,37	0,04	0,04	0,03	0,02
Nd	1,26	1,32	0,15	0,16	0,09	0,08

Sm	0,24	0,24	0,04	0,04	0,02	0,02
Eu	0,05	0,05	0,01	0,01	<0,01	<0,01
Gd	0,26	0,23	0,05	0,05	0,02	0,02
Tb	0,03	0,03	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Dy	0,18	0,19	0,05	0,06	0,01	0,01
Ho	0,04	0,04	0,01	0,02	<0,01	<0,01
Er	0,10	0,10	0,04	0,04	<0,01	<0,01
Tm	0,01	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Yb	0,09	0,09	0,04	0,04	<0,01	<0,01
Lu	0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Hf	0,02	0,02	0,01	0,01	<0,01	0,01
Pb	0,88	0,90	0,13	0,16	0,03	0,03
Th	0,42	0,43	0,04	0,05	0,01	0,01
U	1,15	1,19	0,51	0,56	0,03	0,02

Os elementos traços permitem a distinção entre os carbonatos de diferentes fontes, analisados neste estudo. O carbonato de cálcio de *L. calcareum* apresentou teores de elementos traços cerca de uma ordem de magnitude acima dos carbonatos de cálcio de ostra e de origem mineral. Dentre os elementos traços analisados, vários estão abaixo dos limites de detecção em CaCO₃ mineral e CaCO₃ de ostra (Tabela 2.4).

O principal fator determinante desta diferença é a composição mineralógica, pois *L. calcareum* é composto por calcita e aragonita, enquanto as outras amostras de carbonato de cálcio são compostas exclusivamente por calcita. Há diferenças na partição de elementos traços entre os minerais calcita, aragonita e dolomita em função das diferenças entre suas estruturas cristalinas.⁴⁰

As Figuras 2.8 e 2.9 mostram os teores de elementos traços (ppm) divididos pela composição média da crosta superior terrestre (PAAS, *Post Archean Australian Shale*),⁴¹ forma comumente utilizada de representação de dados em geoquímica, pois facilita a discussão dos processos de formação dos materiais naturais. Quanto aos elementos terras raras (Figura 2.8), as amostras de *L. calcareum* mostraram padrão

praticamente horizontal, indicando que não há incorporação seletiva preferencial de elementos terras raras individuais.

As amostras de CaCO_3 mineral e CaCO_3 de ostra apresentaram teores inferiores, com várias lacunas nos padrões de terras raras por elementos que estão abaixo do limite de detecção, dificultando a observação de tendências. Não obstante, a amostra de CaCO_3 mineral apresentou tendência e enriquecimento de terras raras médias e pesadas (Eu-Lu) em relação aos terras raras leves (La-Sm).

No diagrama multielementos (Figura 2.9), onde os elementos são ordenados pelo potencial iônico (carga/raio iônico), foi observado que os teores de praticamente todos os elementos são mais elevados em *L. calcareum*, com exceção de bário, mais abundante no CaCO_3 mineral, e de estrôncio, mais abundante na CaCO_3 de ostra. O estrôncio, em particular, é elemento traço abundante em toda as amostras, com teores na faixa de centenas de ppm (Tabela 2.4), isto se dá tanto pela abundância deste elemento nos sistemas naturais, como pela sua similaridade de raio iônico e carga com o cálcio ($\text{Sr}^{2+} \approx \text{Ca}^{2+}$), que permite sua entrada em carbonatos de cálcio naturais, sejam eles biogênicos ou não.

Figura 2.8: Padrões de elementos terras raras das amostras de carbonatos normalizados pela composição média da crosta terrestre (PAAS, *Post Archean Australian Shale*)⁴¹

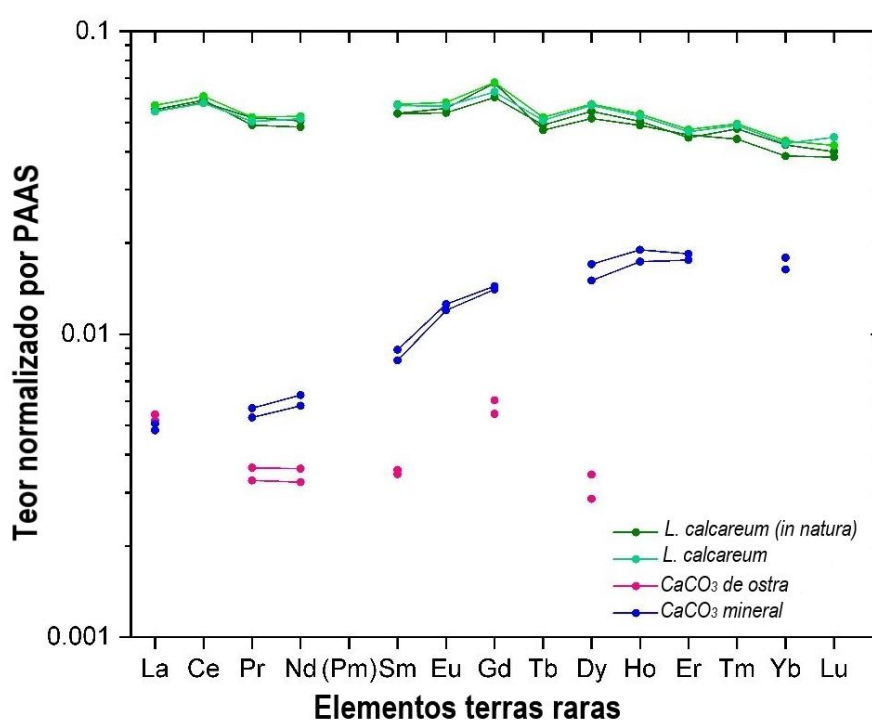
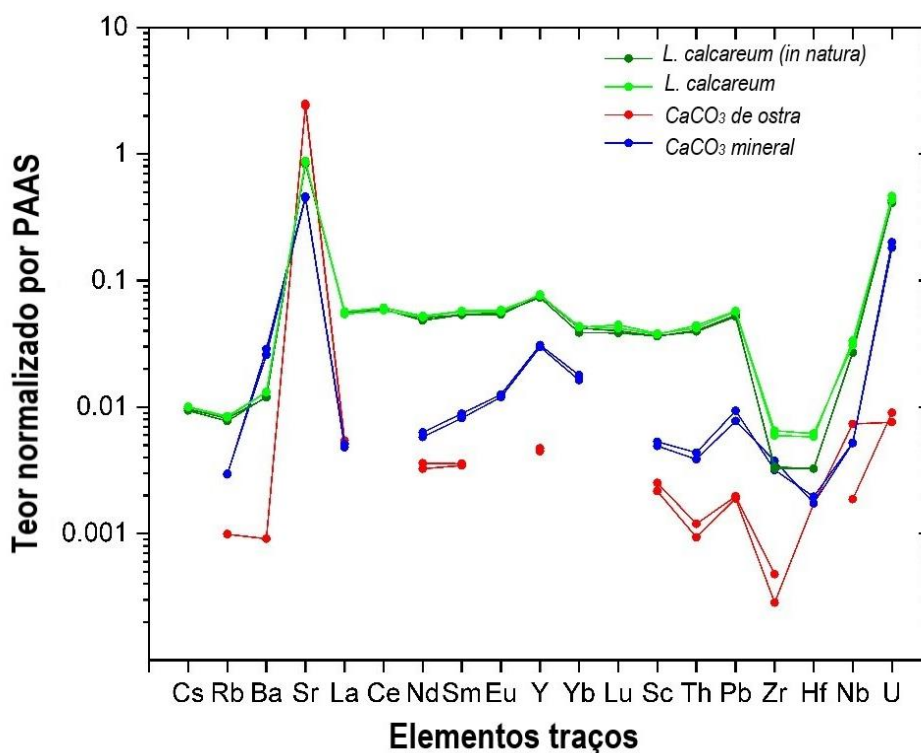


Figura 2.9: Distribuição de elementos traços das amostras de carbonatos normalizados pela composição média da crosta terrestre (PAAS, *Post Archean Australian Shale*)⁴¹



Os dados de isótopos estáveis de carbono e oxigênio (Figura 2.10) de *L. calcareum* e de CaCO_3 de ostra estão dentro do campo dos carbonatos marinhos biogênicos de água rasa, com pequeno fracionamento em relação ao padrão V-PDB.⁴²

Os dados publicados de isótopos estáveis de *L. calcareum* são raros, se restringindo ao estudo de algas carbonáticas (*Lithothamnion sp.* e *Halimeda sp.*, ambas compostas por calcita e aragonita) realizado por Rocha,⁴³ em amostras coletadas no litoral do nordeste brasileiro. As amostras de *L. calcareum* analisadas nesse estudo se situam dentro do campo composicional de 66 amostras analisadas por Rocha,⁴³ que descreve variações nas razões isotópicas em amostras coletadas em diferentes profundidades, como consequência da temperatura da água.

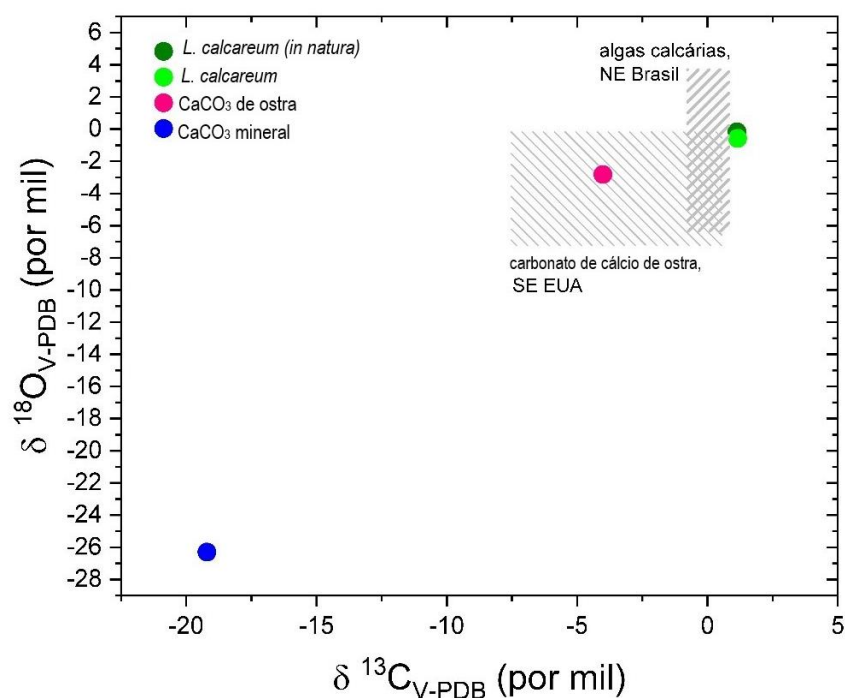
Em relação à composição isotópica do CaCO_3 de ostra, o termo ‘ostra’ engloba uma variedade de famílias de moluscos bivalves de água salgada, com ampla distribuição geográfica, o que dificulta a delimitação de um campo de variação

isotópica. Para fins de comparação, foi usado o intervalo isotópico de ostra *Crassostrea virginica* do estuário do Rio James, Virginia (EUA), publicado por Grimm e colaboradores.⁴⁴ A amostra de CaCO_3 de ostra analisada no presente estudo se situa dentro do intervalo composicional desta espécie.

O CaCO_3 mineral apresentou valores negativos de $\delta^{13}\text{C}$ e oxigênio $\delta^{18}\text{O}$. O CaCO_3 mineral é um carbonato extra leve empregado na indústria farmacêutica, possivelmente precipitado quimicamente em processo industrial de cristalização controlada e sua composição isotópica refletirá a composição das matérias-primas, influenciada pela temperatura e cinética do processo de cristalização.

O pequeno número de dados isotópicos coletados no presente estudo não permitiu descrever tendências, mas indicou que a composição isotópica pode ser usada, com dado adicional na distinção de carbonatos biogênicos. Esse estudo é pouco consolidado na indústria farmacêutica e podemos considerar que dados de isótopos de matéria prima é parte importante de caracterização, do planejamento e desenvolvimento de produtos.

Figura 2.10: Isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) dos carbonatos analisados, em referência ao padrão V-PDB.⁴² As hachuras indicam o campo de composição isotópica de algas carbonáticas do nordeste do Brasil⁴³ e de CaCO_3 de ostra da costa sudeste dos EUA.⁴⁴



4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados aqui apresentados, é possível afirmar que o CaCO_3 proveniente da alga marinha *L. calcareum* é significativamente diferente daquelas amostras de origem mineral e de ostra. A similaridade entre as amostras se dá apenas pelo resultado do fluxo de pós comprometido que, por consequência disso, inviabiliza o processo de produção de comprimidos, que pode ter influência pelo tamanho das partículas.

L. calcareum se difere em tamanho de poros, área superficial e loop de histerese H3 em relação as demais amostras. Todavia, é classificado como um material ultramicroporoso, assim como a amostra de CaCO_3 de ostra. Além disso, os eventos térmicos definem de forma coesa, os resultados de decomposição e perda de massa dos três tipos de CaCO_3 , mas é na amostra de *L. calcareum* que os valores se distanciam mais.

Não obstante, a morfologia de *L. calcareum* não indica a sua definição, mas na composição o teor de cálcio está presente em quantidade suficiente. A amostra ainda se destaca pelos elementos químicos presentes que está constituídos principalmente por carbono, oxigênio e magnésio. Duas fases cristalinas são identificadas em *L. calcareum*, sendo elas a calcita e aragonita, enquanto para o CaCO_3 mineral e CaCO_3 de ostra, apenas a calcita.

Ao avaliar a análise multivariada, é possível discriminar os 3 grupos, cujo grupos são as respectivas amostras. Todas as variáveis influenciam, e aquelas que mais se destacam são o teor de cálcio e tamanho de poro.

Na composição química de *L. calcareum*, a quantidade de oligoelemento está mais evidente que nas demais amostras e isso depende da origem do material. No geral, não se identifica os elementos Al, Cr, Se, Cu, Mo, Pb entre outros em elevada quantidade.

Ademais, os elementos traços permite a distinção entre os carbonatos de diferentes fontes, e dentre os elementos traços analisados, vários estão abaixo dos limites de detecção. Entretanto, o principal fator determinante desta diferença é a composição mineralógica de cada amostra.

Os dados de isótopos estáveis são análises importantes para determinar a procedência do material. Nesse sentido, embora seja raro publicações que sita o campo composicional de *L. calcareum*, esta se restringe ao estudo de algas carbonáticas do litoral do nordeste brasileiro. Da mesma forma, a amostra de CaCO_3 de ostra se encontra no intervalo composicional de uma espécie identificada no estuário do Rio James (EUA). Por outro lado, não é possível distinguir a origem de CaCO_3 mineral.

Em resumo, a abordagem quanto a caracterização físico-química de um material gera conhecimento para a indústria farmacêutica, especialmente quando se trata da sua origem e do seu comportamento. Além de auxiliar no desenvolvimento de formulações, garante processos robustos, uma produção eficiente, consistente e de elevada qualidade.

5. REFERÊNCIAS¹

- [1] MORSE, J.W.; ARVIDSON, R.S.; LÜTTGE, A. Calcium Carbonate Formation and Dissolution. **Chem. Rev.**, v. 107, p. 342–381, 2007. <https://doi.org/10.1021/cr050358j>
- [2] AL OMARI, M.M.H.; RASHID, I.S.; QINNA, N.A. et al. Calcium carbonate. Chapter Two. **Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology**, v.41, p. 31-132, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.podrm.2015.11.003>
- [3] GOLOB, A.L.; LAYA, M.B. Osteoporosis Screening, Prevention and Management. **Rev Med Clin N Am**, v. 99, p. 587–606, 2015. [DOI: 10.1016/j.mcna.2015.01.010](https://doi.org/10.1016/j.mcna.2015.01.010)
- [4] NAKAMURA, Y.; SUZUKI, T.; KAMIMURA, M. et al. Vitamin D and calcium are required at the time of denosumab administration during osteoporosis treatment. **Bone Research**, v. 5, p. 1-7, 2017. <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.21>
- [5] LANGDAHL, B.L. New treatments of osteoporosis. **J. Osteoporosis and Sarcopenia**. v. 1, p. 4-21, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.afos.2015.07.007>
- [6] COSTA, A.L.D.; SILVA, M.A.C.N.; BRITO, L.M.O. et al. Osteoporosis in primary care: an opportunity to approach risk factors. **Rev Brasileira de Reumatologia**. v. 56, nº 2, p.111–116, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2015.03.004>
- [7] MARKL, D.; WANG, P.; RIDGWAY, C. et al. Characterisation of the Pore Structure of Functionalised Calcium Carbonate Tablets by Terahertz Time-Domain Spectroscopy and X-ray Computed Microtomography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, Issue 6, p. 1586-1595, June 2017. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.02.028>
- [8] CABIOCH, J. Contribution a l'Étude Morphologique, Anatomique et Systématique de deux Mélobésiécs: *Lithothamnium calcarenm* (Pallas) Areschoug et *Lithothamnium corallioides* Crouan. **Botanica Marina**, v.IX, 1969.
- [14] BANG, J.H.; JANG, Y.N.; KIM, W. et al. Specific surface area and particle size of calcium carbonate precipitated by carbon dioxide microbubbles. **Chemical Engineering Journal**, p. 254-260, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.05.081>
- [9] BAILEY, J.C. Molecular Systematics of Red Algae. 1996. Theses (Doctor of Philosophy) - Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College, p. 40-

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

44, 1996. Disponível em: <https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_disstheses/6316>. Acesso em: 20 de maio de 2019

[10] ALMEIDA, F.; SHIAVO, L.V.; VIEIRA, A.D., et al. Gastroprotective and toxicological evaluation of the *Lithothamnium calcareum* algae. **J. Food and Chemical Toxicology**. v. 50, p. 1399–1404, 2012. [doi:10.1016/j.fct.2012.02.028](https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.028)

[11] DESIDERI, D.; CANTALUPPI, C.; CECCOTTO, F. et al. Essential, and toxic elements in seaweeds for human consumption. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**. v. 79:3, p. 112–122, 2016. <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2015.1113598>

[12] JIMOH, O.A.; ARIFFIN, K.S.; HUSSIN, H.B., et al. Synthesis of precipitated calcium carbonate: a review. **Carbonates Evaporites** v.33, p. 331–346, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13146-017-0341-x>

[13] LÓPEZ-BENITO, M. Estudio de la composición química del *Lithothamnium calcareum* (Aresch) y su aplicación como corrector de terrenos de cultivo. **Inv. Pes.** v.23, p.53-70, 1963.

[14] DÉLÉRIS, P., NAZIH, H., BARD, J.M. Seaweeds in Human Health. **Seaweed in Health and Disease Prevention**, p. 319–367, 2016. [https:// DOI:10.1016/B978-0-12-802772-1.00010-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802772-1.00010-5)

[15] BANG, J.H.; JANG, Y.N.; KIM, W. et al. Specific surface area and particle size of calcium carbonate precipitated by carbon dioxide microbubbles. **Chemical Engineering Journal**, p. 254-260, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.05.081>

[16] UNITED States Pharmacopeia National Formulary. 42. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2019.

[17] LOWELL, S.; SHIELDS, J.E.; THOMAS, M. A. et al. Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density. Published by Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2004. 349 p. (livro)

[18] KLOBES, P.; MEYER, K.; MUNRO, G. Porosity and Specific Surface Area Measurements for Solid Materials, National Institute of Standards and Technology, 2006. 89 p. (livro)

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- [19] COD. Crystallography Open Database. <http://www.crystallography.net/cod/>
Acesso em 28 de Agosto de 2020
- [20] RIETVELD, H.M. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. **J Appl Crystallogr**, v. 2 (2), p. 65-71, June 1969. <https://doi.org/10.1107/S0021889869006558>
- [21] NAVARRO, M.; ANDRADE, S.; ULBRICH, H. et al. The Direct Determination of Rare Earth Elements in Basaltic and Related Rocks using ICP-MS: Testing the Efficiency of Microwave Oven Sample Decomposition Procedures. **Geostandards and Geoanalytical Research**, v.32, p. 167 - 180, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1751-908X.2008.00840.x>
- [22] HUANG, Z.; SCICOLONE, J.V.; HAN, X. et al. Improved blend and tablet properties of fine pharmaceutical powders via dry particle coating. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, p. 447–455, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.068>
- [23] SUN, C.C. Quantifying effects of moisture content on flow properties of microcrystalline cellulose using a ring shear tester. **Powder Technology**, v.289 p.104-108, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2015.11.044>
- [24] CABISCOL, R.; FINKE, J. H.; ZETZENER, H. et al. Characterization of Mechanical Property Distributions on Tablet Surfaces. **Pharmaceutics**, v. 10, 184, p. 1-24, 2018. <https://doi:10.3390/pharmaceutics10040184>
- [25] AHUJA, G.; PATHAK, K. Porous Carriers for Controlled/Modulated Drug Delivery. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71:6, p.599-607, 2009. <doi:10.4103/0250-474X.59540>
- [26] SCHÜTH, F.; SING, K.S.W.; WEITKAMP, J. Handbook of Porous Solids. p. 3207, 2002. <https://doi:10.1002/9783527618286>
- [27] THOMMES, M.; KANEKO, K.; NEIMARK, A.V. et al. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.** 87, 1051–1069, 2015. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- [28] XIA, X.; CHEN, J.; SHEN, J. et al. Synthesis of hollow structural hydroxyapatite with different morphologies using calcium carbonate as hard template. **Adv. Powder Technol.** v.29, p.1562–1570, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2018.03.021>
- [29] D'ELIA, A; PINTO, D.; ERAMO, G. et al. Effects of processing on the mineralogy and solubility of carbonate-rich clays for alkaline activation purpose: mechanical, thermal activation in red/ox atmosphere and their combination. **Applied Clay Science**, v.152, p. 9–21, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.11.036>
- [30] LI, X.-G.; YANG, L.V.; MA, B-G., et al. Decomposition kinetic characteristics of calcium carbonate containing organic acids by TGA. **Arabian Journal of Chemistry**, 8 p., 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.09.026>
- [31] WOODWARD, V.; WILLIAMS, R.; AMJAD, Z. Analytical Techniques for Identifying Mineral Scales and Deposits, In book: *The Science and Technology of Industrial Water Treatment*, p. 425-445, Abril 2010. [DOI: 10.1201/9781420071450-c21](https://doi.org/10.1201/9781420071450-c21)
- [32] THRIVENI, T.; UM, N.; NAM, S.Y. et al. Factors Affecting the Crystal Growth of Scalenohedral Calcite by a Carbonation Process. **Journal of the Korean Ceramic Society**. v. 51 (2), p. 107-114, 2014. <https://doi.org/10.4191/kcers.2014.51.2.107>
- [33] UKRAINCYK, M.; GREDIČAK, M.; JERIĆ, I. et al. Interactions of Scalenohedral Calcite Crystals with Acidic Amino Acid Derivatives of Salicylic Acid. **Cryst. Growth Des.** v. 14, p. 4335–4346, 2014. <https://dx.doi.org/10.1021/cg500396x>
- [34] BAENA-MORENO, F.M.; PRICE, C.A.H.; SACHÉ, E. et al. Physicochemical comparison of precipitated calcium carbonate for different configurations of a biogas upgrading unit. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 94, p. 2256–2262, 2019. <https://doi:10.1002/jctb.6013>
- [35] SRONSRI, C.; U-YEN, K.; SITTIPOL, W. Quantitative analysis of calcium carbonate formation in magnetized water. **Journal Pre-proof**, 28 p., 2020. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.122735>
- [36] RATTANACHAIWONGA, S.; SINGERB, P. Diets and Diet Therapy: Trace Elements. **Encyclopedia of Food Security and Sustainability**, v. 2, p. 143-160, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21941-0>

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- [37] CANNAS, D.; LOI, E.; SERRA, M., et al. Review: Relevance of Essential Trace Elements in Nutrition and Drinking Water for Human Health and Autoimmune Disease Risk. **Nutrients**, v.12, p. 1-22, 2020. <https://doi:10.3390/nu12072074>
- [38] MEHRI A. Trace elements in human nutrition (II) – An update. **Int J Prev Med.**, v. 11: 2, p. 1-17, 2020. doi:10.4103/ijpvm.IJPVM_48_19
- [39] WORLD HEALTH ORGANIZATION Trace elements in human nutrition and health. Geneva: World Health Organization, p. 360, 1996. Disponível em: < <https://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241561734/en/>. Acesso em: 04 de agosto de 2020.
- [40] VEIZER, J. Trace elements and isotopes in sedimentary carbonates. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, v. 11(1), p. 265-299, 1983.
- [41] TAYLOR, S. R.; MCLENNAN, S. M. *The Continental Crust: Its Composition and Evolution*, Ed. Blackwell, 1985. 298 p. (livro).
- [42] SHARP, Z. *Principles of stable isotope geochemistry*. Prentice Hall, New Jersey, 2006. 344 p. (livro).
- [43] ROCHA, C.M.S. **Estudo químico de *Lithothamnion sp.* e *Halimeda sp.* no nordeste brasileiro**. 2013. Tese (Doutorado em Geologia - Hidrogeologia e Recursos Minerais) - Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2013. Disponível em: < http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/15684/1/2013_tese_cmsrocha.pdf Acesso em: 14 de maio de 2020.
- [44] GRIMM, B.L.; SPERO, H.J.; HARDING J. M. et al. Seasonal radiocarbon reservoir ages for the 17th century James River, Virginia estuary. **Quaternary Geochronology** xxx, p. 1-15, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.quageo.2017.03.002>

CAPÍTULO III

Reometria de pós úmidos: as melhores condições para granulação úmida empregando diluente e aglutinante em amostras de carbonato de cálcio

REOMETRIA DE PÓS ÚMIDOS: AS MELHORES CONDIÇÕES PARA GRANULAÇÃO ÚMIDA EMPREGANDO DILUENTE E AGLUTINANTE EM AMOSTRAS DE CARBONATO DE CÁLCIO

RESUMO

O cálcio é um componente importante para manutenção óssea e prevenção da osteoporose e pode ser encontrado na forma de dosagem de comprimido para suplementação alimentar. No entanto, por conter uma elevada quantidade de cálcio elementar (Ca^{++} 500 mg), a produção de tais comprimidos depende das propriedades de fluxo e compactação do material. Nesse caso, a granulação úmida é o processo mais adequado e o Mixer Torque Rheometer (MTR) pode ser empregado como uma ferramenta para estudar as características da granulação úmida de carbonato de cálcio. Assim, o objetivo deste trabalho foi selecionar as melhores condições para posterior produção de grânulos de diferentes fontes de carbonato de cálcio, empregando a reometria de pós úmidos. Para isso, foi utilizado um delineamento experimental completo, bem como os parâmetros para avaliação (razão e torque máximo) dos experimentos. Cada amostra de carbonato de cálcio foi caracterizada por testes de tamanho de partícula e densidade verdadeira. Os resultados mostraram que as amostras são diferentes em tamanho de partícula, com diâmetro médio de 3,25-82,0 μm e densidade verdadeira entre 2,666-3,106g.mL⁻¹. A análise estatística demonstrou que o ponto de granulação é variável de acordo com a amostra e, quando se utiliza celulose microcristalina PH101 e pectina, é necessário um menor volume de água em relação à goma gelana.

Palavras-chave: Granulação úmida, reometria de torque, carbonato de cálcio mineral, carbonato de cálcio de ostras, carbonato de cálcio da alga marinha *Lithothamnium calcareum*

1. INTRODUÇÃO

O carbonato de cálcio é amplamente utilizado para prevenção de osteoporose, uma doença óssea que leva a fraturas, o que afeta cerca de 200 milhões de pessoas no mundo, e cuja tendência é de aumento, conforme se registra o envelhecimento da população.^{1, 2} No mercado farmacêutico, esse elemento está disponível como suplemento na forma de comprimidos, dentre outras formulações, sendo o mais indicado atualmente para manter a capacidade de redução do risco da osteoporose e reposição de cálcio no organismo.^{3,4}

O carbonato de cálcio pode ser obtido de diversas fontes, incluindo o carbonato de cálcio de ostras, que foi reconhecido como fonte de Ca^{++} na dieta, o carbonato de cálcio mineral que é amplamente consumido como suplemento dietético e o carbonato de cálcio proveniente da alga marinha *Lithothamnium calcareum* (*L. calcareum*), extraída do fundo do mar a partir de seus sedimentos. Considerando a dose a ser administrada (500 mg de cálcio elementar), é um exemplo clássico de aplicação da granulação úmida, que viabiliza a produção de comprimidos com elevado teor de cálcio elementar.^{5, 6, 7, 8, 9}

Nesse contexto, *L. calcareum* se apresenta como uma nova fonte de íons Ca^{++} que, no entanto, tem sido pouco explorada e, principalmente, pouco estudada.^{9, 10} Em particular, não há trabalhos na literatura científica que explorem sua caracterização física quanto ao tamanho de partículas e densidade verdadeira, tampouco a reologia de massa úmida e seu processamento, visando utilizá-lo como um suplemento alimentar na forma de comprimido, dentre outras formas farmacêuticas.

A granulação úmida é um dos processos mais tradicionais para a produção de comprimidos, sendo amplamente utilizada na indústria farmacêutica quando se trata de formulações cujo ingrediente ativo está em alta proporção, permitindo a aglomeração das partículas finas em partículas maiores. Além disso, este método requer a determinação exata do chamado ponto de granulação, estabelecendo o agente de granulação apropriado, bem como a quantidade de líquido (geralmente água) a ser empregado.¹¹

A esse respeito, o Mixer Torque Rheometer (MTR) é uma ferramenta que fornece quantitativamente as características para obter grânulos por granulação úmida. Mede

a resistência da massa dada pelo torque máximo à mistura e determina o ponto de granulação, a chamada fase capilar. Os resultados são reprodutíveis e mais significativos que o processo manual e de tentativa e erro. Conseqüentemente, a produção dos granulados se torna mais robusta, uma vez que a quantidade de água a ser utilizada na formulação pode ser determinada com facilidade e precisão.^{12, 13, 14,15}

O objetivo do presente trabalho foi selecionar, por meio da reometria por via úmida, as melhores condições para a posterior produção de grânulos a partir de diferentes fontes de carbonato de cálcio, incluindo *Lithothamnium calcareum*, utilizando celulose microcristalina PH101 como diluente e goma gelana e pectina como aglutinantes. Nós investigamos, adicionalmente, a influência desses componentes nas condições mais adequadas para granulação úmida das amostras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Carbonato de cálcio de origem marinha *L. calcareum* (Lithocálcio Indústria, Comércio, Importação, Exportação e Representação Ltda, Brasil), carbonato de cálcio de ostras (Opção Fênix Distribuidora de Insumos Ltda, Brasil) e o carbonato de cálcio de origem mineral extra leve (Valdequímica Produtos Químicos Ltda, Brasil) foram selecionados nesse estudo, assim como a celulose micro Cristalina Avicel® PH101 (FMC, Estados Unidos), a goma gelava Kelcogel CG-LA® e pectina GENU® Pectin tipo USP/100 (CPKelco do Brasil S.A, Brasil). A água ultrapurificada (Milli-Q® - Merck Millipore, Brasil) foi utilizada com temperatura ambiente (25°C). Não houve tratamento prévio das amostras.

2.2 Métodos

2.2.1 Caracterização das amostras

2.2.1.1 Análise de tamanho de partícula

A distribuição do tamanho de partícula (diâmetro (d): d₁₀, d₅₀ and d₉₀) das amostras de carbonato de cálcio, foi determinado em equipamento de difração de

raios laser Granulometer Cilas 1090 (Cilas, Orleans, França) configurado para operar no modo via líquida. O método de Fraunhofer,¹⁶ foi selecionado para a medida do diâmetro do volume ($d_{[4,3]}$) das partículas. Cada amostra foi dispersa em um béquer contendo 20 mL de água e os parâmetros utilizados para avaliação foram o tempo de análise (30 segundos e 120 rotações por minuto) e tempo de circulação (40 segundos e 320 rotações por minuto). O resultado do diâmetro do volume das partículas foi obtido a partir da média de dez medições.

2.2.1.2 Densidade verdadeira

Os ensaios foram realizados em picnômetro de gás Hélio Ultrapycnometer 1000 (Quantachrome Corporation, Flórida, Estados Unidos), conforme procedimento descrito na Farmacopeia Americana.¹⁷ As amostras foram pesadas e transferidas para o porta amostra de 10,8 cm³. Foi utilizado gás hélio sob pressão de 20 psi, mantida em temperatura ambiente (25°C). A densidade verdadeira foi calculada em g.mL⁻¹, dada pelas Equações 1 e 2.^{18, 19} Os resultados foram registrados a partir de cinco medições de volume e densidade.

Equação 1:

$$V_P = V_C + \frac{V_R}{1 - (P_1/P_2)}$$

Equação 2:

$$\rho_{\text{True}} = \frac{m_s}{V_s}$$

Onde:

V_P : massa volume (pó)

V_C : célula da amostra

V_R : volume de referência

P_1 : pressão inicial

P_2 : pressão final

Onde:

ρ_{True} : densidade verdadeira

m_s : massa sólida

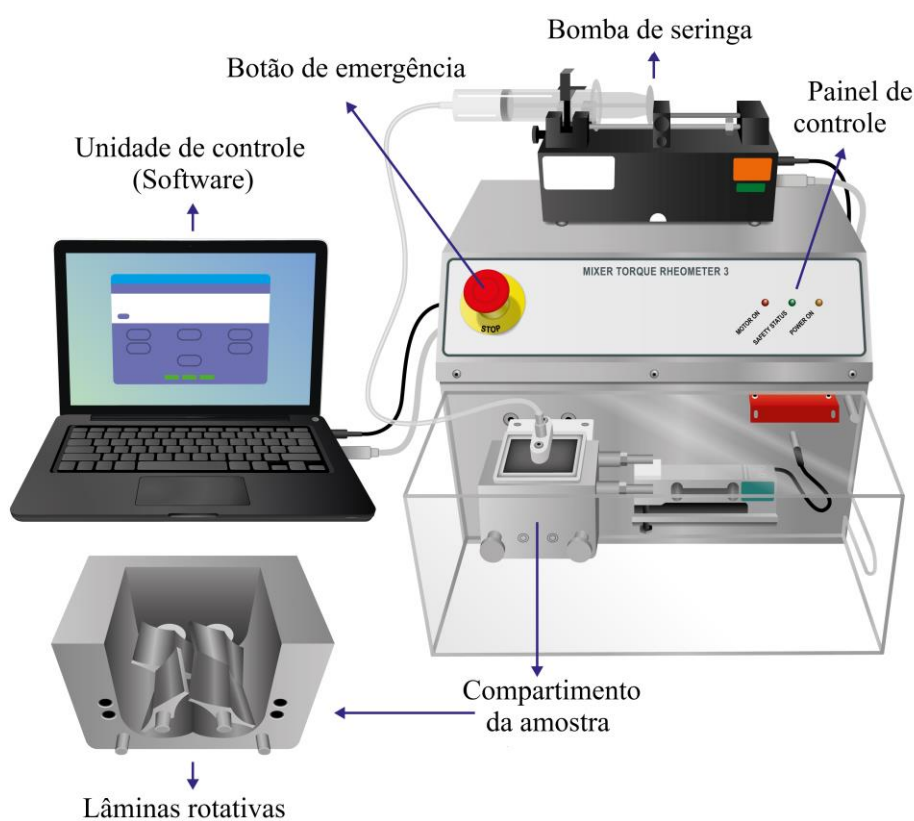
V_s : volume da massa sólida

2.2.2 Reometria de torque

O Mixer torque rheometer - MTR (Caleva, Reino Unido) com o software Caleva Process Solutions Ltd (Figura 3.1), é um equipamento utilizado para caracterizar a

reologia de pós úmidos, fornecendo medições quantitativas, significativas e reprodutíveis da formulação, obtendo uma faixa de torque de 0 a 5 N.m. O torque é medido por intermédio de pás rotativas, sendo então possível obter o ponto de granulação através da adição do líquido granulante que é dispensado e medido pela seringa. O MTR não é capaz de obter granulado, mas tão somente estudar as melhores condições para posterior granulação. Este equipamento é sobretudo útil na etapa de formulação, quando poderemos então selecionar o melhor aglutinante, a concentração adequada de diluente, a quantidade exata de água, dentre outros parâmetros importantes para se obter o melhor granulado.

Figura 3.1: Representação do equipamento MTR. As lâminas rotativas se encontram no compartimento da amostra.



Fonte: própria autora

O método de múltipla adição foi empregado,^{14, 20} e os parâmetros aplicados foram 20 pontos com adições de 1 mL (água), tempo de mistura (60 segundos), velocidade das pás (50 rotações por minuto), tempo de coleta dos dados (20 segundos) e peso de cada amostra (20 gramas).

Após a leitura do compartimento vazio do reômetro (torque da linha de base = 0), 20 gramas da massa homogeneizada foi transferida para a porta amostra. A medição do torque foi obtida (Equação 3), e ao final de cada tempo de mistura com a adição da água, calculando-se o torque médio com base em 35 leituras individuais de cada ponto durante 20 segundos de leitura. Ao concluir a adição da água e os valores de torque da linha média de todos os pontos de dados brutos medidos, em cada formulação foi determinado a relação entre a adição de líquido (mL), que nesse caso foi o volume de água adicionado/ pela massa inicial (g), contendo o carbonato de cálcio, diluente e aglutinante. O torque máximo ($T_{\text{máx}}$) (N.m) alcançado, é o ponto de granulação (fase capilar), em que o $T_{\text{máx}}$ corresponde a massa úmida x a razão máxima líquido/sólido ($L/S_{\text{máx}}$) ou razão em consequência da maior resistência da mistura.^{13, 14}

Equação 3:

$$T = F (m.a).D \qquad T = m.a.D$$

Onde:

T = torque

F = força igual à massa x aceleração ($m.a$)

D = distância de uma extremidade à outra das lâminas rotativas

2.2.2.1 Delineamento dos experimentos

Um delineamento experimental completo em software Estatística 13.0 (Dell Inc., Estados Unidos), apresentado nas Tabelas 3.1 e 3.2, foi utilizado para compor as formulações, de modo a avaliar a influência das quantidades de diluente (celulose microcristalina - Avicel[®] PH101) e o aglutinante (goma gelana e pectina) no processo de granulação úmida.

Um teste prévio no MTR foi realizado para determinar a concentração dos aglutinantes, aplicando uma faixa de 0,03% a 10% dos excipientes. O T_{max} dos componentes foi avaliado individualmente, comparando ao torque de *L. calcareum*.

Tabela 3.1 – Variáveis e os respectivos níveis (-1, 0, +1) empregados no delineamento experimental fatorial completo.

VARIÁVEIS	NÍVEIS
Diluyente	10 – 20 – 30
Aglutinantes	Goma gelana / 10 Goma gelana / 5 + pectina / 5 pectina / 10

Tabela 3.2 – Matriz de ensaio com fatorial completo (3^2) de 9 formulações + 2 pontos centrais.

Ensaio	Diluyente / %	Aglutinantes / %
1	10	gelana / 10
2	10	gelana / 5 + pectina / 5
3	10	pectina / 10
4	20	gelana / 10
5	20	gelana / 5 + pectina / 5
6	20	pectina / 10
7	30	gelana / 10
8	30	gelana / 5 + pectina / 5
9	30	pectina / 10
10	20	gelana / 5 + pectina / 5
11	20	gelana / 5 + pectina / 5

2.2.2.2 Análise estatística

O software Statistic 13.0 (Dell Inc., EUA) foi utilizado para avaliação estatística das variáveis quantidade de diluente, aglutinante e volume da água, assim como o torque. Foi realizada análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5% ($p = <0,05$), a partir do qual foram gerados gráficos de Pareto, superfícies de resposta e gráficos das médias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que as amostras de carbonato de cálcio são distintas entre si (Tabela 3.3 e Figura 3.2), com o tamanho de partícula distribuído entre 1,34-212,51 μm .

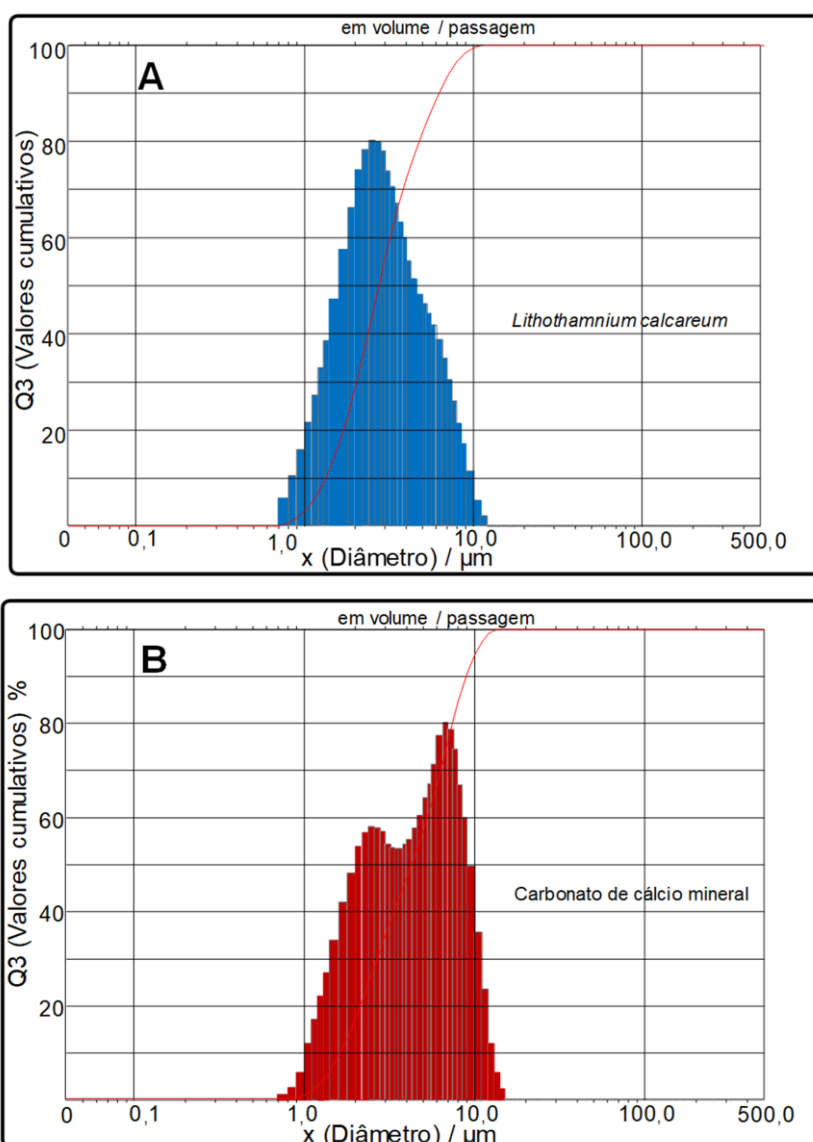
As amostras de *L. calcareum* (A) e carbonato de cálcio mineral (B) apresentaram partículas muito finas (1.34 – 9.06 μm), ao contrário do carbonato de cálcio de ostras (C) que mostrou uma maior polidispersão, que é quando há ausência de homogeneidade e pode comprometer a compactação do material no processo de produção.²¹ Nesse caso, a distribuição do tamanho das partículas de carbonato de cálcio de ostras foi de 5.99 – 212.51 μm . Na amostra B, observamos uma distribuição bimodal, indicando sua menor homogeneidade, que pode ser devido a aglomeração de partículas individuais, como discutido por Jung et al.,²² em amostras de carbonato de cálcio. Deve-se notar que o pequeno tamanho de partícula observado nas amostras A e B pode facilitar a absorção de cálcio,²³ mas o manuseio e o processamento do material podem ser dificultados, pois as propriedades de fluxo da amostra podem ser significativamente prejudicados.²⁴

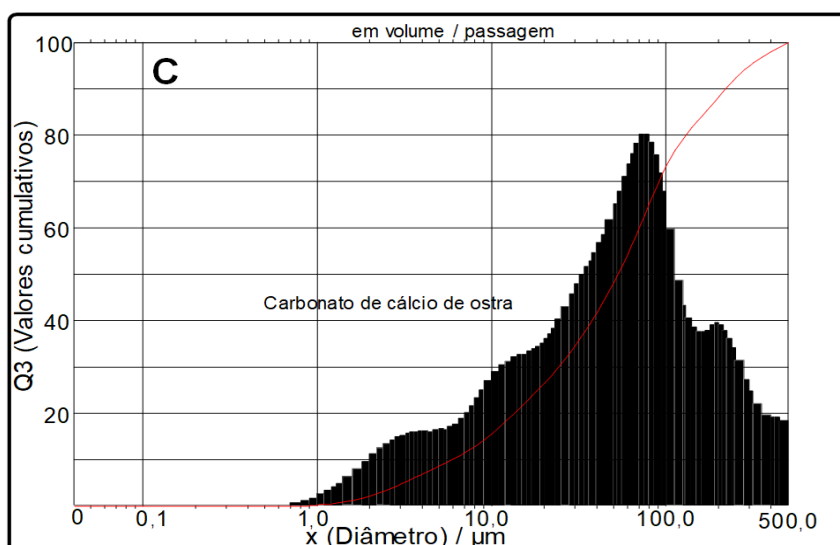
O que se verifica no gráfico C, é que a amostra proveniente de ostras apresenta um tamanho de partículas muito superior às outras. Como consequência, a avaliação desta amostra foi prejudicada por conta da faixa de leitura do equipamento utilizado. Porém, como indicaram os resultados, 90% das partículas se encontram abaixo de 212,51 μm , ou seja, a análise executada cobre praticamente toda a distribuição desta amostra. O equipamento apresentou um tamanho médio de partícula para a amostra de carbonato de cálcio de ostras de 82,0 μm , que, muito embora não seja o valor exato, indica, indubitavelmente, que este material apresenta partículas muito maiores.

Tabela 3.3 - Tamanho de partículas (μm) das amostras de carbonato de cálcio. d_{10} , d_{50} e d_{90} correspondem a porcentagem (%) das partículas.

Amostras	d_{10}	d_{50}	d_{90}	Média (μm)
<i>Lithothamnium calcareum</i>	1,34	2,64	6,25	3,25
Carbonato de cálcio mineral	1,62	4,25	9,06	4,86
Carbonato de cálcio de ostras	5,99	49,96	212,51	82,00

Figura 3.2: Histograma de valores cumulativos das amostras de *L. calcareum* (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C).





Outra característica importante para o processamento do material é a densidade. Foi registrado semelhança nos resultados para *L. calcareum* com valores de $3,004 \pm 0,02 \text{ g. mL}^{-1}$ e carbonato de cálcio mineral $3,106 \pm 0,03 \text{ g.mL}^{-1}$. Para o carbonato de cálcio de ostras a densidade foi de $2,696 \pm 0,02 \text{ g.mL}^{-1}$.

Segundo Lowell e colaboradores,¹⁸ quanto menor o tamanho de partículas, maior é a densidade verdadeira. Essa relação não pôde ser observada para as amostras de carbonato de cálcio, devido possivelmente, suas características cristalinas (presença de cálcita). Sharif et al.,¹⁹ descreveu que a densidade verdadeira desse tipo de material pode ser melhor calculada com base em sua estrutura, utilizando o método de difração de raios-x.

Uma vez realizado a análise de tamanho de partículas e densidade verdadeira, a caracterização de pós úmidos ocorreu em MTR. O MTR é uma ferramenta usada para caracterização de pós úmidos e vem sendo empregado para determinar o ponto de granulação por intermédio do T_{\max} e volume de água (L/S_{\max}) ou razão.^{13, 14, 20}

Nos testes prévios (Figuras 3.3 e 3.4), para selecionar uma faixa de 0,03% a 10% dos aglutinantes, o melhor torque registrado foi exatamente para 10% dos aglutinantes goma gelana e pectina, individualmente. A faixa de aplicação do aglutinante não está definida na literatura e a concentração de 10% mostrou

homogeneidade nas formulações testadas, garantindo aglutinação e, conseqüentemente, o ponto de granulação sem excesso de adição de água.

Figura 3.3: Testes prévios no MTR pelo Método de Múltipla Adição, que utilizou a goma gelana em solução 0,03%, goma gelana 0,5%, 5% e 10% com a adição da água.

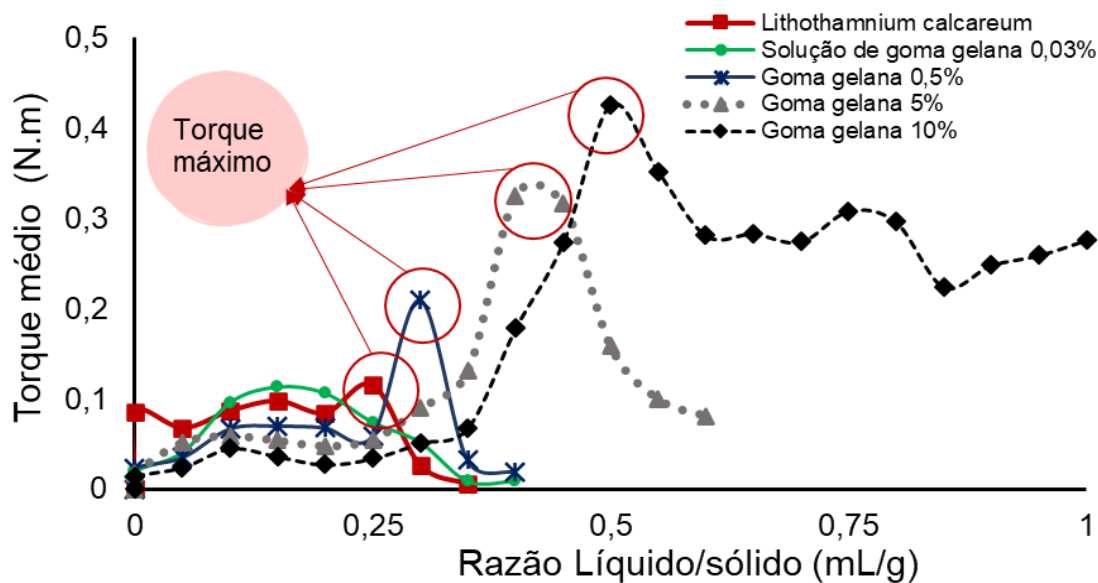
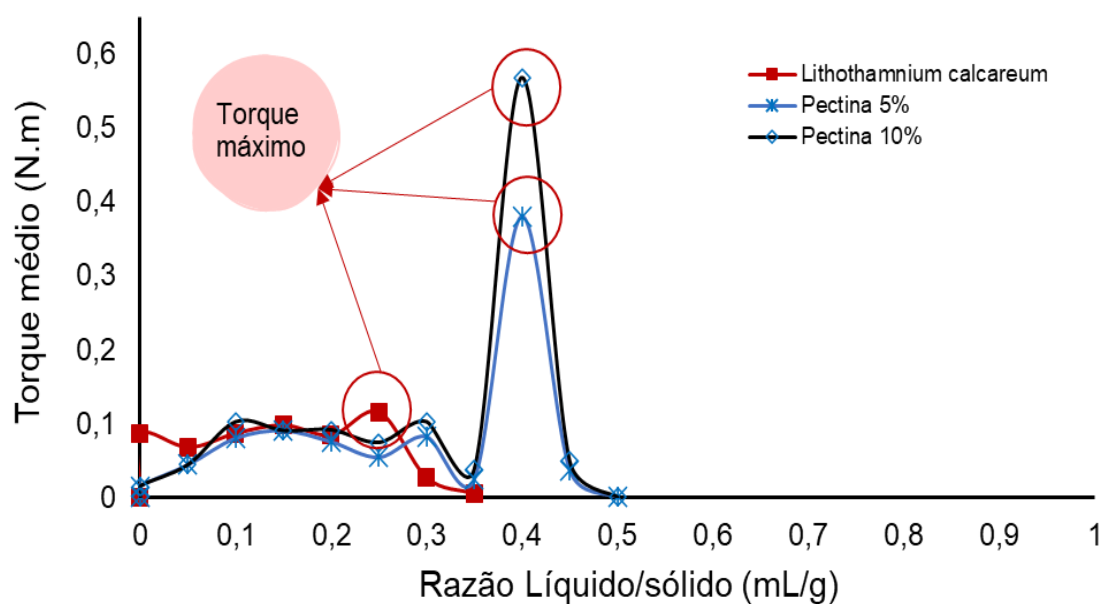


Figura 3.4: Testes prévios no MTR pelo Método de Múltipla Adição, que utilizou a pectina em 5% e 10% com a adição da água.

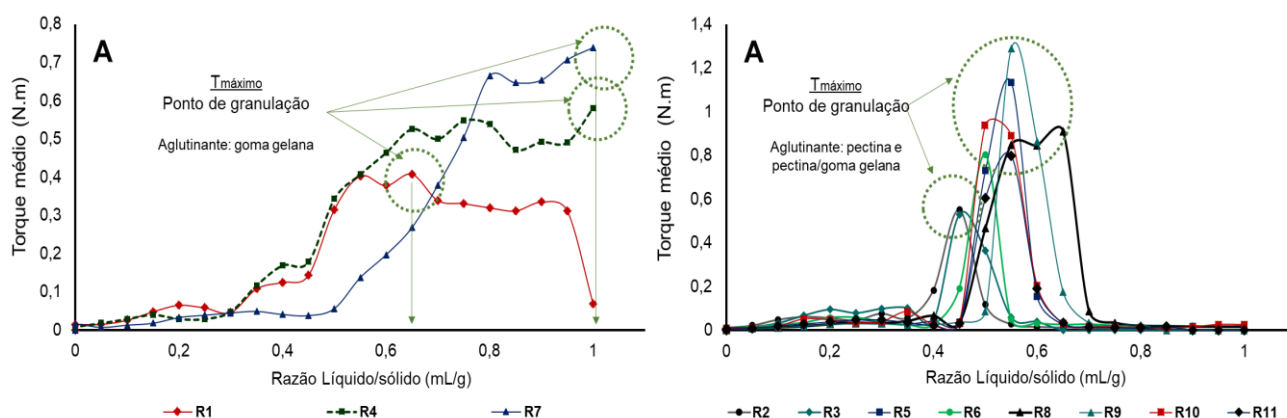


Nossos resultados da reometria de massa úmida das amostras de carbonato de cálcio (Figura 3.5 e Tabela 3.4) mostraram que a razão L/S se apresentou distinta quanto aos valores de torque e quantidade de água, permitindo obter o ponto de granulação para cada uma. Os valores de torque variaram entre 0,275 - 2,133 (Nm) e razão L/S entre 0,45 - 1,00 (mL / g), isto é, 9 mL - 20 mL de água purificada.

As amostras se apresentaram diferentes como apontado nos perfis de T_{\max} versus L/S, em que foi observado a variabilidade no eixo, permitindo que a amostra A obtivesse pico máximo de torque de até 1,289 N.m e valor de razão L/S de 0,45-0,8 mL/g. A amostra B apontou pico máximo de 2,133 N.m e 0,55 -1 mL/g com elevado torque indicativo e pico <1,177 N.m e 0,55-0,8 mL/g para a amostra C. Observamos que a amostra B absorveu um volume maior de água do que as amostras A e C.

Mais especificamente, foi observado que o carbonato de cálcio mineral (B) registrou torques mais elevados, necessitando, também, de um volume de água maior (12-20 mL) quando comparado ao T_{\max} de *L. calcareum* (A) e carbonato de cálcio de ostras (C).

Figura 3.5: Experimentos em equipamento de reometria de torque que utilizou diluente celulose microcristalina e os aglutinantes goma de gelana e pectina e a mistura pectina e goma gelana para *L. calcareum* (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C).



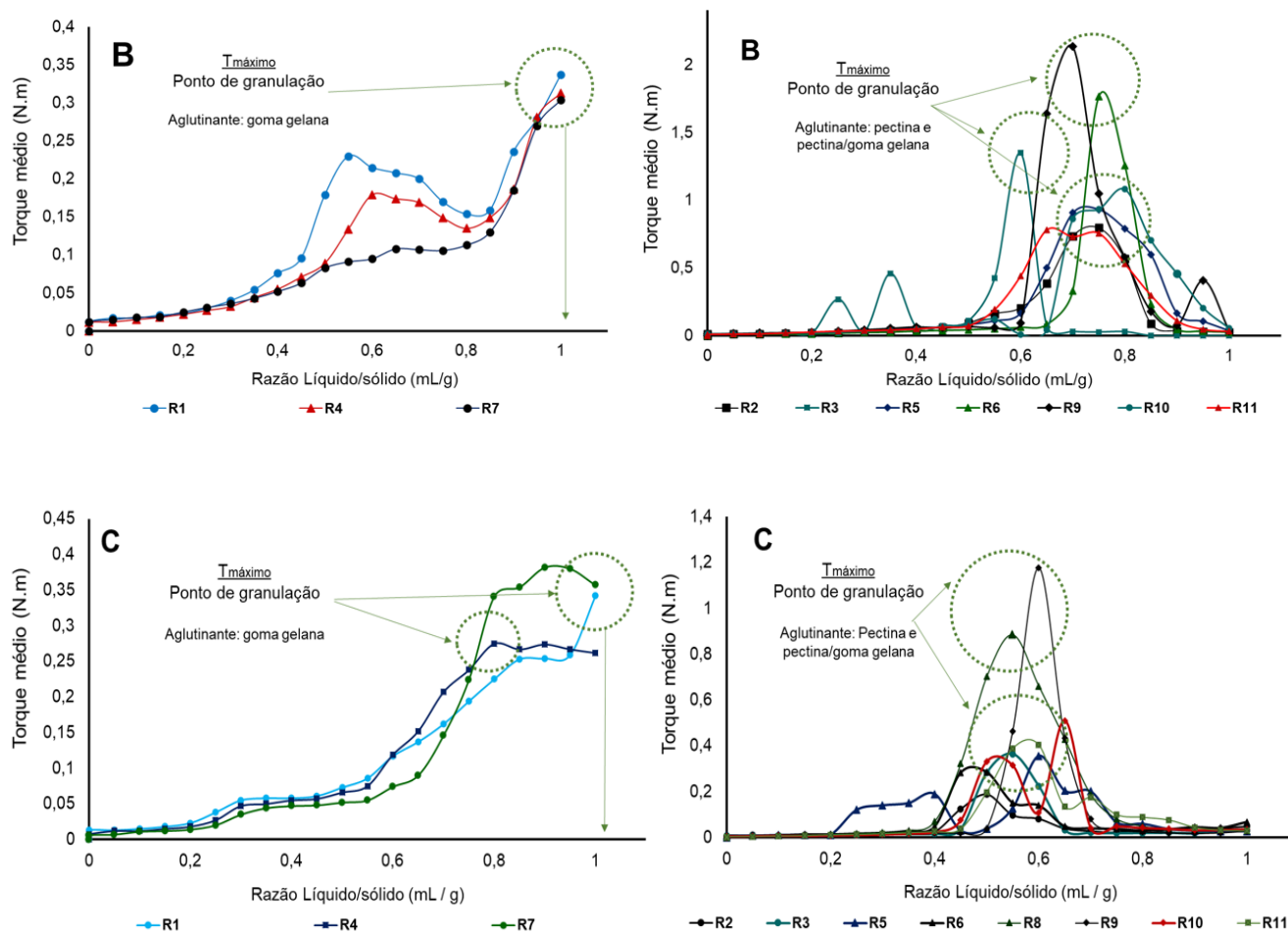


Tabela 3.4 - T_{\max} e razão L/S_{\max} para as amostras *L. calcareum* (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C).

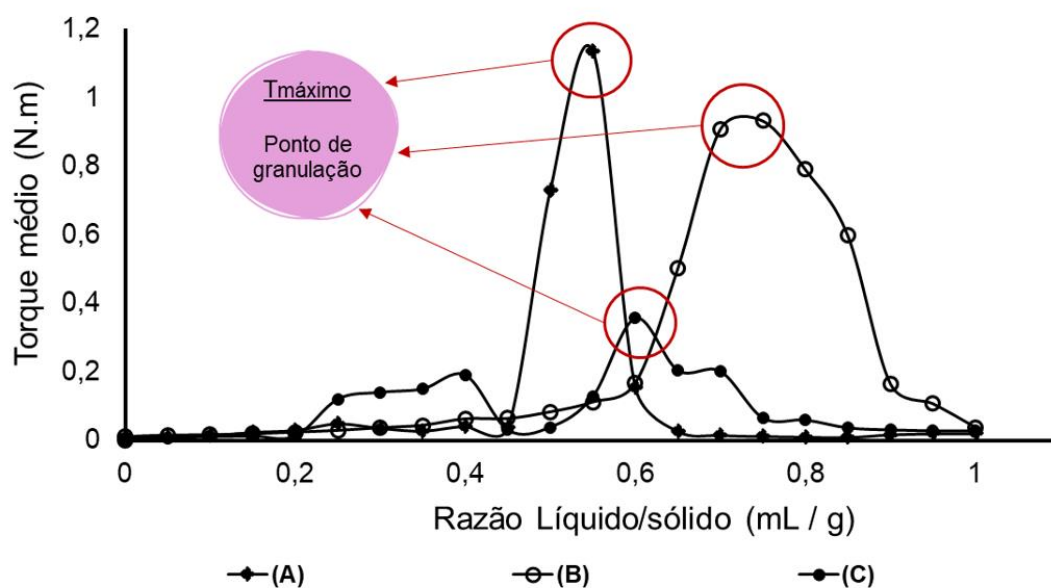
Ensaio	Torque _{max} (N.m)			L/S _{max} (mL/g)		
	A	B	C	A	B	C
1	0,408	0,337	0,342	0,65	1,00	1,00
2	0,552	0,798	0,188	0,45	0,75	0,50
3	0,531	1,348	0,364	0,45	0,60	0,55
4	0,581	0,313	0,275	1,00	1,00	0,80
5	1,135	0,932	0,356	0,55	0,75	0,60

6	0,805	1,766	0,285	0,50	0,75	0,50
7	0,739	0,304	0,382	1,00	1,00	0,90
8	0,910	1,486	0,885	0,65	1,00	0,55
9	1,289	2,133	1,177	0,55	0,70	0,60
10	0,892	1,082	0,332	0,55	0,80	0,50
11	0,800	0,755	0,404	0,55	0,75	0,60

A título de exemplificação, selecionamos o experimento 5 (Figura 3.6) para mostrar o T_{\max} e razão L/S_{\max} observados para as amostras de carbonato de cálcio e o tempo em que cada um atingiu o ponto de granulação. O *L. calcareum*, alcançou um torque de 1,135 N.m em 11 minutos, enquanto para carbonato de cálcio mineral o torque foi de 0,932 N.m em 15 minutos e carbonato de cálcio de ostras, 0,356 N.m em 12 minutos.

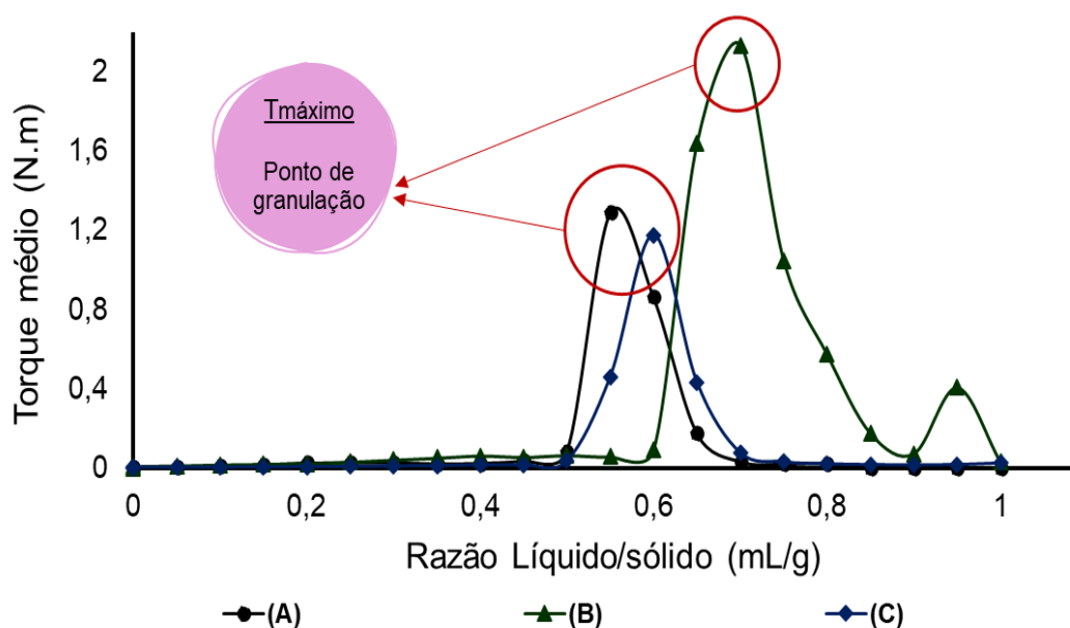
Com relação ao tempo que seria, então, muito longo para a produção industrial, é importante enfatizar que os experimentos realizados apontaram a melhor composição para produção de grânulos de carbonato de cálcio de diferentes fontes, indicando, por exemplo, que a pectina se mostrou como o melhor aglutinante, pois a sua utilização resulta em torque mais elevado. Entretanto, numa eventual produção industrial de grânulos de carbonato de cálcio, o tempo de processamento irá depender de outros fatores, como o tamanho do lote, o equipamento de granulação que está a ser empregado, dentre outros. Portanto, o MTR não indica o tempo de processamento do material em escala industrial, mas os componentes, que, adicionados à formulação, nos permitirão obter as melhores condições de granulação úmida.

Figura 3.6: Experimento 5 realizado no equipamento MTR, que aplicou o diluente celulose microcristalina PH101 (20%) e os aglutinantes goma gelana e pectina (5-5%) para *L. calcareum* (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C).



Na Figura 3.7, destacamos o experimento 9, onde cada formulação apresentou o ponto de granulação com nível máximo de celulose microcristalina e de pectina. Nestas condições, obteve-se o T_{\max} e um menor volume de água para *L. calcareum* e carbonato de cálcio de ostras. Para o carbonato de cálcio mineral, tanto o volume de água quanto o torque foi mais elevado.

Figura 3.7: Experimento 9 com a mistura diluente celulose microcristalina PH101 (30%) e o aglutinante pectina (10%) para *L. calcareum* (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C) na determinação do T_{\max} .

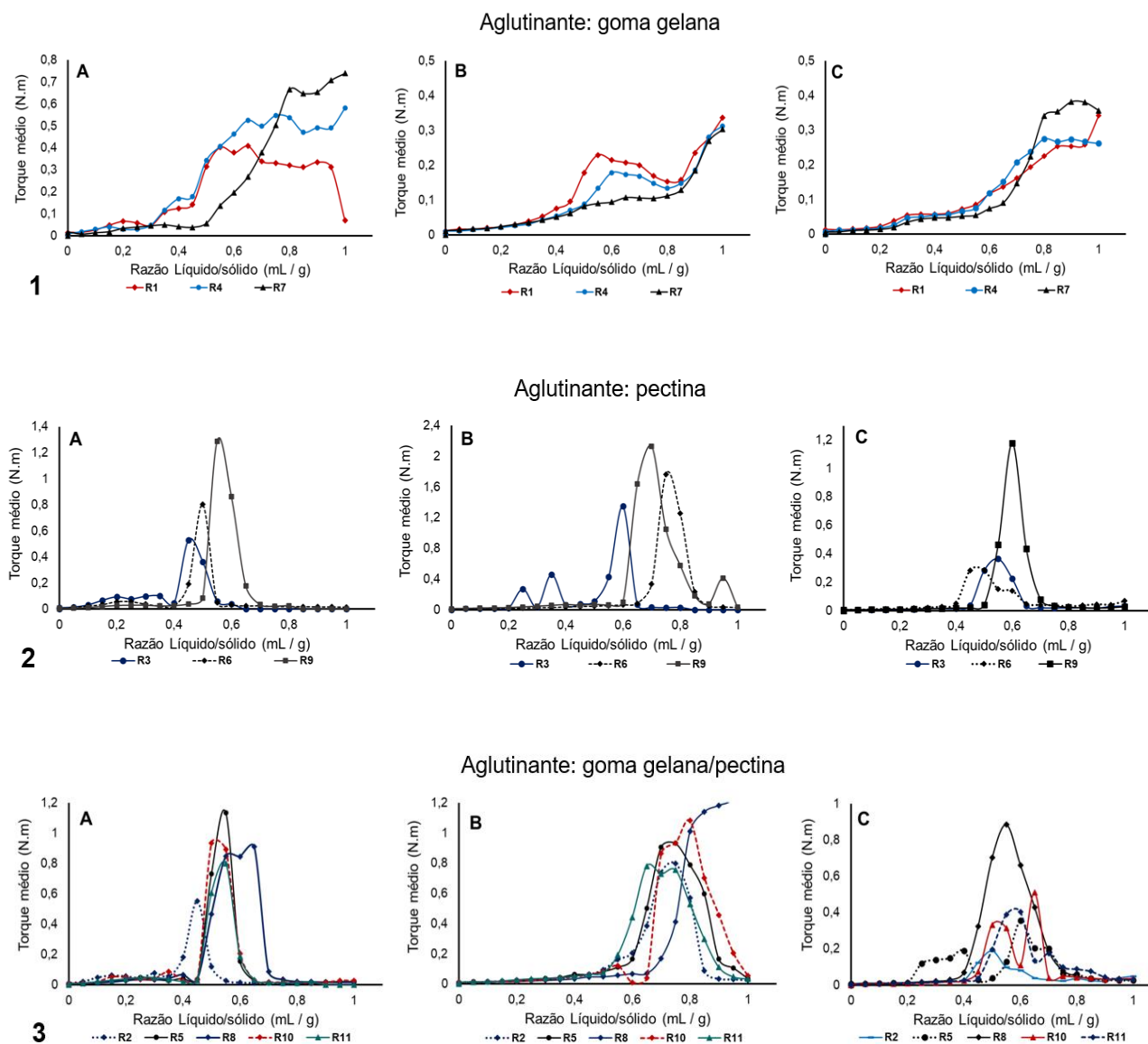


No entanto, os aglutinantes aqui utilizados (goma gelana e pectina), são polissacarídeos cuja função é aglomerar as partículas de pó, o que é facilmente obtido devido à sua elevada viscosidade, que é capaz de exercer um efeito positivo para alcançar o ponto de granulação.²⁵

A goma gelana, Figura 3.8 (1A, 1B e 1C) mostrou características diferentes em comparação com a pectina (2A, 2B e 2C) e a mistura de goma gelana-pectina (3A, 3B e 3C). Em 1A, o torque se elevou à medida que a concentração de celulose microcristalina aumentou. Nesse caso, o volume de água demandado foi de 13 mL de água quando utilizou 10% de diluente, 18 mL de água quando empregou 20% de diluente e 20 mL de água quando usou 30% de diluente. Em 1C, o mesmo comportamento se observa para carbonato de cálcio de ostras. Em se tratando de 1B, por sua vez, exigiu o volume máximo de água (20 mL) nos três experimentos (R1, R4 e R7) e o torque obtido foi em média de 0,318 N.m.

A presença da pectina nas amostras de carbonato de cálcio (2A, 2B e 2C) também produziu resultados diferentes, principalmente para a amostra de carbonato de cálcio de ostras (2C), que registrou um torque <0,400 N.m para R3 e R6. Em 2A, o volume de água exigido para *L. calcaireum* foi menor e semelhante entre os experimentos, e o torque, em contrapartida, <0,530 N.m. Para 2B, o carbonato de cálcio mineral demandou um volume de água maior e conseqüentemente, um torque mais elevado em relação às amostras 2A e 2C. Na mistura de goma gelana e pectina (3A, 3B e 3C), notamos que o T_{max} foi alcançado somente em R8 que continha 30 % de celulose microcristalina e a mistura dos aglutinantes goma gelana e pectina.

Figura 3.8: 1: Experimentos contendo o diluente celulose microcristalina_{PH101} e o aglutinante goma gelana 10% para *L. calcaireum* (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C) na determinação do T_{max} . 2: Experimentos contendo o diluente celulose microcristalina_{PH101} e o aglutinante pectina 10% para *L. calcaireum* (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C) na determinação do T_{max} . 3: Experimentos contendo o diluente celulose microcristalina_{PH101} e a mistura dos aglutinantes goma gelana-pectina (5-5%) para *L. calcaireum* (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C) na determinação do T_{max} .



Obtivemos o maior torque com o menor volume de água, quando uma mistura da concentração 5-5% (goma gelana/pectina) e 10% de pectina foi adicionada à *L. calcareum* (3A) e carbonato de cálcio de ostras (3C). No entanto, o carbonato de cálcio mineral (3B), nestas condições, exigiu um elevado volume de água, principalmente na presença de 10% de pectina.

Com relação a celulose microcristalina, que foi o diluente aqui utilizado, a partir dos nossos experimentos, é possível verificar que quanto maior a concentração utilizada, maior o torque observado, mesmo que a concentração máxima tenha sido de 30%. Diante disso, é possível afirmar que a celulose microcristalina exerce um

papel fundamental na formulação, capaz de melhorar a fluidez, além de homogeneidade das partículas e outras propriedades inerentes.²⁵ São essas características reológicas da celulose microcristalina que tornaram as formulações de carbonato de cálcio aqui testadas, adequadas para mostrar o ponto de granulação para cada um dos ensaios, independentemente da sua origem. O emprego da celulose microcristalina com um aglutinante (polímero) na granulação úmida, melhora ainda mais a reologia dos pós, oferecendo características adequadas para o processo. De fato, este é um dos excipientes mais utilizados na granulação úmida devido, exatamente, às suas características reológicas.^{14, 25, 26}

Na análise estatística aplicamos ANOVA e incluímos o modelo de interações bidirecionais (Linear-Quadrático) para comparar as variáveis. Para a variável água da amostra *L. calcareum*, o modelo que melhor explicou os resultados foi Linear-Linear.

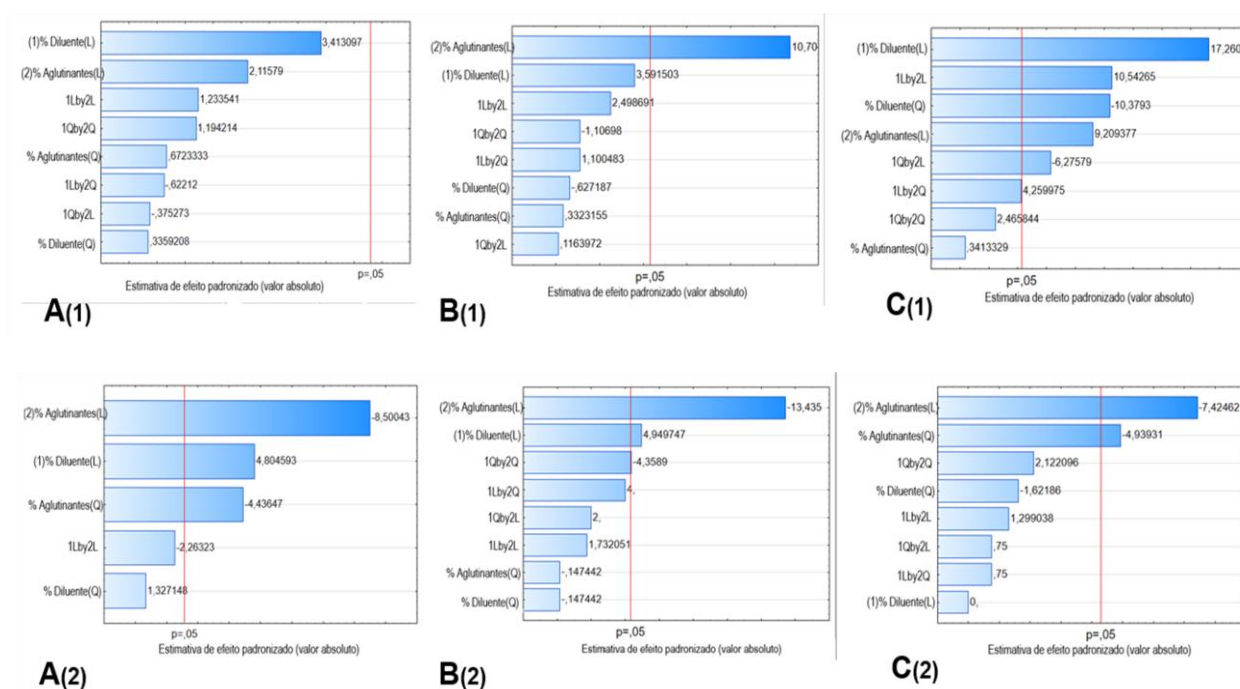
Conforme ilustrado na Figura 3.9, nenhuma variável estudada foi capaz de influenciar o torque em *L. calcareum* (A1), enquanto a quantidade de água (A2) necessária para granular foi influenciada pelo aglutinante e pelo diluente usado (quanto maior a concentração do diluente, exigiu maior volume de água e, conseqüentemente, ao usar goma gelana, o que também pode ser observado na Tabela 3.4).

No caso da amostra de carbonato de cálcio mineral (B), o torque (B₁) foi impactado pelo aglutinante quando a pectina foi utilizada. Nesta situação a quantidade de água requerida para alcançar o T_{máx} foi menor. Além do aglutinante, o torque também foi influenciado pelo diluente, exibindo valores mais elevados à medida que a concentração aumentou. Para a amostra carbonato de cálcio de ostras (C), o torque (C₁) foi condicionado pelas duas variáveis (diluente e aglutinante), em ambas as funções (linear e quadrática), e a quantidade de água (C₂) necessária para granular foi influenciada apenas pelo aglutinante.

Esses resultados mostraram claramente que as diferentes fontes de carbonato de cálcio requerem condições diferentes para granulação, exigindo uma abordagem específica para cada caso. As razões para estes comportamentos, devem-se provavelmente as estruturas distintas de cada fonte de CaCO₃. Nosso grupo está

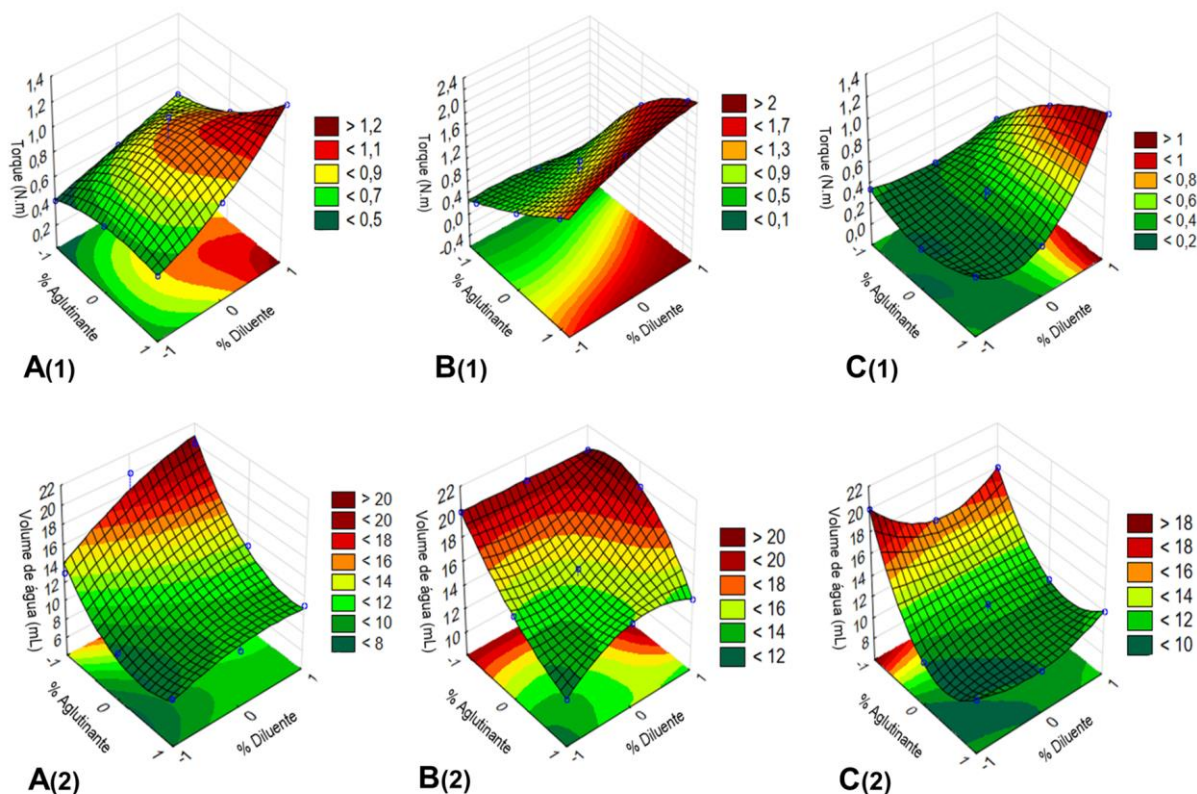
empenhado em compreender melhor a natureza dessas fontes, especialmente no caso de *L. calcareum* para o qual não existem dados esclarecedores na literatura.

Figura 3.9: Gráficos de Pareto que representaram a análise de variância e seus componentes lineares (L) e quadráticos (Q) dos parâmetros de torque (1) e água (2) - (diluyente-aglutinante) de amostras de *L. calcareum* (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C). Valores absolutos significativos para $p < 0,05$.



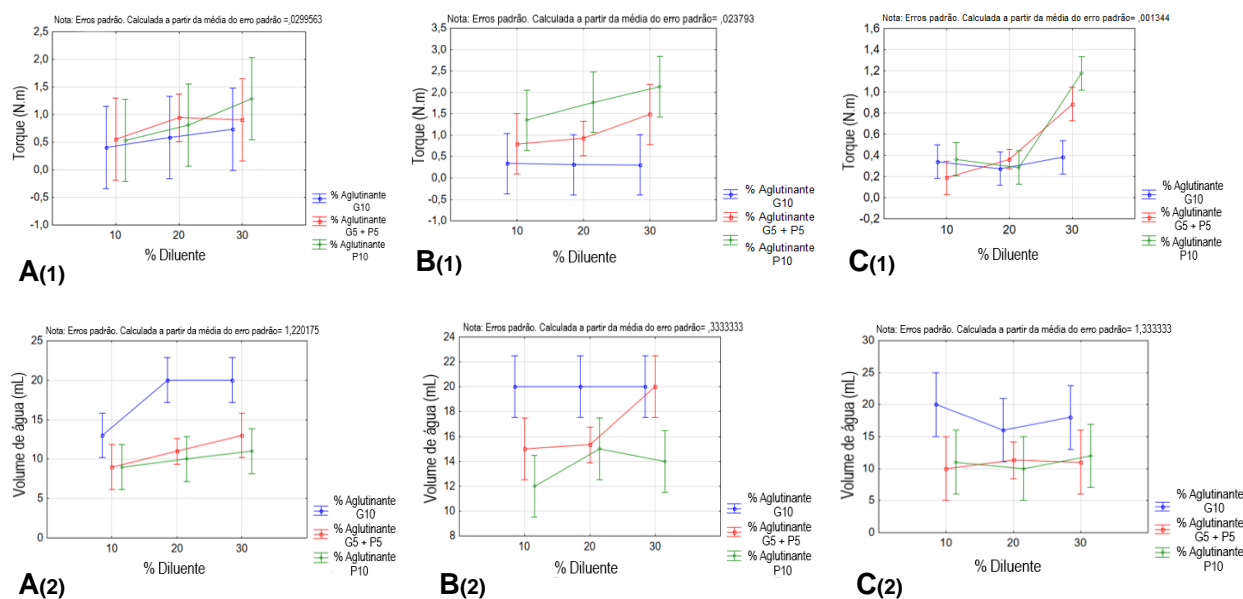
Da mesma forma, os gráficos de superfície resposta (Figura 3.10) mostraram a influência de fatores na razão variável dependente e no torque. Nessas condições, é possível observar que a quantidade de diluyente é um fator de destaque entre os parâmetros testados, onde podemos notar que quanto maior a quantidade de diluyente, maior o valor do torque. Mesmo no caso de *L. calcareum*, para o qual o diluyente não foi significativo (10% de diluyente), foi exibida uma resposta (T_{max}) com maior concentração de celulose microcristalina (30%).

Figura 3.10: Gráficos de superfície de resposta indicando o efeito diluyente-aglutinante no torque (1) e água (2) para as amostras de *L. calcareum* (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C).



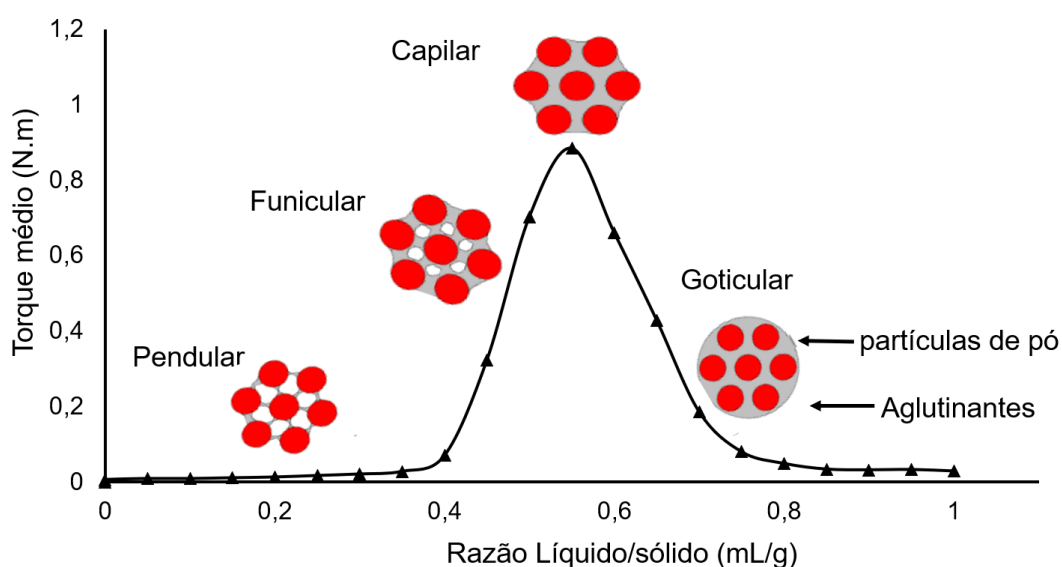
Avaliando os gráficos das médias dos fatores (Figura 3.11), foi possível observar que a utilização de pectina a 10% proporcionou os valores mais elevados de torque, especialmente para o carbonato de cálcio de origem mineral (amostra B1).

Figura 3.11: Gráficos das médias de torque (1) e água (2), indicando o efeito diluente-aglutinante para as amostras de *L. calcareum* (A), carbonato de cálcio mineral (B) e carbonato de cálcio de ostra (C).



Além disso, no caso da quantidade de água necessária para granulação úmida, o que se verifica é que a goma gelana 10% exigiu um volume maior em todos os experimentos. Portanto, a granulação úmida quando efetuada com a pectina, conduz a resultados mais adequados para torque e, ao empregar-se goma gelana, a quantidade de água requerida foi mais elevada, independentemente do tipo de carbonato de cálcio. Para melhor compreensão e interpretação dos nossos resultados, é interessante recorrer ao modelo descrito na Figura 3.12, que é a representação esquemática do torque obtido em função da razão líquido/sólido para o experimento 8, com a amostra de carbonato de cálcio de ostras.

Figura 3.12: Processo de saturação de líquido no aglomerado de partículas. Representação esquemática utilizando o perfil da relação razão líquido/sólido e torque máximo do experimento 8 da amostra de carbonato de cálcio de ostra. Fonte: Adaptado de Barker e Robinson ¹²



O ponto de granulação é formado pelo mecanismo de aglomeração de partículas, denominado fase capilar, que foi mais bem detalhado por Sakr et al.²⁷ A fase capilar corresponde ao torque máximo das análises, que determina a quantidade exata de água para o ponto de granulação de cada experimento.

De acordo com este modelo (Figura 3.12), a granulação apresenta 4 fases: pendular, funicular, capilar (torque máximo) e goticular. Nas fases iniciais (pendular e funicular), não é possível obter grânulos, o que acontece somente quando a massa de pós úmidos atinge a fase capilar. Com a adição de um excesso de água, o ponto de granulação se satura e o que observamos é uma massa excessivamente úmida. Portanto, o que desejamos é alcançar a fase capilar, que corresponde ao torque máximo.

Nossos resultados mostraram que a fase capilar é atingida de maneira diferente para cada formulação. A concentração de 30% de celulose microcristalina atuou como facilitador do processo de granulação úmida, uma vez que nestas condições os valores de torque foram os mais elevados. Assim, para posterior granulação das formulações, aplicando um menor volume de água, a pectina apresentou o melhor comportamento.

Assim, a pectina se apresentou como um aglutinante interessante para a granulação úmida de carbonato de cálcio de diferentes fontes. No entanto, para atingir o torque mais alto, cada amostra exigiu uma quantidade diferente de água. *L. calcareum* exigiu o menor volume de água (9 mL), gerando um torque maior. Essa é uma vantagem na granulação úmida, porque uma quantidade menor de água significa menos tempo de secagem ao produzir grânulos.

A amostra de carbonato de cálcio de ostras é aquela que se apresenta a mais diferenciada em comparação às amostras *L. calcareum* e carbonato de cálcio mineral, como exibido especificamente em relação ao tamanho das partículas (Figura 3.2). Essa amostra exigiu uma quantidade maior de celulose microcristalina (30%) para alcançar um torque adequado, o que demonstra a necessidade de caracterizar as amostras de carbonato de cálcio, para evitar variabilidade na produção de grânulos contendo esse suplemento mineral.

O carbonato de cálcio mineral registrou uma maior densidade verdadeira em relação as outras amostras e, portanto, foi aquela que demandou um maior volume de água e obteve os torques mais elevados.

4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, é possível concluir que as melhores condições para a granulação úmida de carbonato de cálcio são obtidas quando se utiliza uma maior quantidade de diluente (celulose microcristalina) e o aglutinante pectina. Quanto maior a concentração de diluente usado, combinado com os aglutinantes, maior o torque. No entanto, o estudo aponta que, ao se utilizar pectina como aglutinante nas amostras, a quantidade de água é menor em relação a goma gelana.

A celulose microcristalina influencia de forma positiva na presença dos aglutinantes goma gelana e pectina, razão essa que permite obter um ponto de granulação para cada uma das formulações, independente da origem do carbonato de cálcio, mas a pectina mostra os valores de torque máximo com maior frequência se comparar com a goma gelana.

O MTR demonstra a proporção da razão L/S para todas as formulações, mesmo na presença da variação de volumes de água de amostra para amostra. Além disso, o equipamento é capaz de mostrar os valores de torque máximo (fase capilar) para obter o ponto de granulação para posterior produção de grânulos.

Dada a importância da suplementação de cálcio para o tratamento da osteoporose, a utilização de diversas fontes de carbonato de cálcio é uma necessidade. Nosso trabalho evidencia a importância de formulações bem caracterizadas quando se trata de reometria de pós úmidos, que possibilita o uso das proporções de diluente e aglutinantes adequadas, pois se esses fatores não são bem explorados podem impactar no processo industrial.

5. REFERÊNCIAS¹

- [1] LANGDAHL, B.L. New treatments of osteoporosis. **J. Osteoporos. Sarcopenia**, v.1 p. 4-2, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.afos.2015.07.007>
- [2] GOLOB, A.L.; LAYA, M.B. Osteoporosis Screening, Prevention and Management. **Rev Med Clin N Am**, v. 99, p. 587–606, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.01.010>
- [3] DANIEL, G.; SCHÖLKOPF, J.; GANE, P.A.C. et al. Fast disintegrating solid dosage form formulation comprising functionalized calcium carbonate and method of their manufacture. Depositante: Omya International AG. **EP 2719373A1**. Depósito:12 out. 2012 Concessão: 16 abr. 2014.
- [4] FLAMMINI, L; MARTUZZIB, F; VIVOA, V. et al. Hake fish bone as a calcium source for efficient bone mineralization. **Int. J. Food Sci and Nutr**. 67:3, p. 265-273, 2016. <https://doi.org/10.3109/09637486.2016.1150434>
- [5] CAI, L.; FARBER, L.; ZHANG, D. et al. A new methodology for high drug loading wet granulation formulation development. **Int. J. Pharm**, v. 441, p. 790-800, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.09.052>
- [6] AL OMARI, M.M.H.; RASHID, I.S.; QINNA, N.A. et al. Calcium Carbonate – chapter two. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, v. 41, p. 31-132, 2016. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2015.11.003>
- [7] DESIDERI, D.; CANTALUPPI, C.; CECCOTTO, F. et al. Feduzia Essential and toxic elements in seaweeds for human consumption. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, part A. v. 79, p. 112-122, 2016. <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2015.1113598>
- [8] VAISMAN, N.; SHALTIEL, G.; DANIELY, M. et al. Increased Calcium Absorption from Synthetic Stable Amorphous Calcium Carbonate: Double-Blind Randomized Crossover Clinical Trial in Postmenopausal Women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 29 (10), p. 2203–2209, October 2014,. <http://doi: 10.1002/jbmr.2255>
- [9] MUHAMMAD, A.N.; NARASIMHARAO, B.; TEJASWI, P. et al. Growth-inhibitory effects of a mineralized extract from the red marine algae, *Lithothamnion calcareum*, on Ca²⁺ - sensitive and Ca²⁺ -resistant human colon carcinoma cells. **Cancer Letters**, v. 283 p. 186–192, 2009. <http://doi:10.1016/j.canlet.2009.03.037>

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- [10] MUHAMMAD, A.N.; JACLYNN, K.M.; TEJASWI, P. et al. A Mineral-Rich Extract from the Red Marine Algae *Lithothamnion calcareum* Preserves Bone Structure and Function in Female Mice on a Western-Style Diet. **Calcif Tissue Int.**, v. 86(4), p. 313–324, 2010. <http://doi:10.1007/s00223-010-9340-9>
- [11] SURESH, P.; SREEDHAR, I.; VAIDHISWARAN, R. et al. A comprehensive review on process and engineering aspects of pharmaceutical wet granulation. **Chem. Eng. J**, v. 328, p. 785-815, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2017.07.091>
- [12] BARKER, J.; ROBINSON, S.W. Opportunities for Mixer Torque Rheometry, Available in: <https://www.caleva.com/uploads/docs/opportunities-for-mixer-torque-rheometry.pdf> Acesso em março de 2018.
- [13] KUSHIS, M.; MOORE, J.; KOLLAMARAM, G. et al. Predicting optimal wet granulation parameters for extrusion-spheronisation of pharmaceutical pellets using a mixer torque rheometer. **Int. J. Pharm**, v. 517 p. 9-24, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.057>
- [14] CHAERUNISAA, A.Y.; SRIWIDODO, S.; ABDASSAH, M. Chapter: Microcrystalline Cellulose as Pharmaceutical Excipient. In book: Pharmaceutical Formulation Design - Recent Practices, p. 01-21, 2019. <http://doi:10.5772/intechopen.88092>
- [15] HASSN, A.Z.; JEBBERGER, S.; HOUNSLOW, M.J. et al. Multi-stage granulation: An approach to enhance final granule attributes. **Chem. Eng. Res. Des**, p. 26-35, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.03.038>
- [16] STEFANO, C.D.; FERRO, V.; MIRABILE, S. Comparison between grain-size analyses using laser diffraction and sedimentation methods. **Biosystems Eng**, v. 106, p. 205-215, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2010.03.013>
- [17] UNITED States Pharmacopeia National Formulary. 42.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2019.
- [18] LOWELL, S.; SHIELDS, J.E.; THOMAS, M.A. et al. Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density, fourth ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 2004.340p. (livro) p.15-79.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- [19] SHARIF, S.; DIMEMMO, L.M.; THOMMES, M., et al. A simplified approach to determine effective surface area and porosity of low bulk density active pharmaceutical ingredients in early development. **Advanced Powder Technology**, v. 26, p. 337–348, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.appt.2014.11.002>
- [20] ZHANG, S.; LAMBERTO, D.J. Development of new laboratory tools for assessment of granulation behavior during bulk active pharmaceutical ingredient drying. **J. Pharm. Sci.**, v. 103, p. 152–160, 2014. <https://doi.org/10.1002/jps.23762>
- [21] JOANNA, W.; MOLENDÁ, M. Effect of particle size distribution on micro- and macromechanical response of granular packings under compression. **International Journal of Solids and Structures**, v. 51, p. 01–38, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijsolstr.2014.06.029>
- [22] JUNG, W.M.; KANG, S.H.; KIM, K.S. et al. Precipitation of calcium carbonate particles by gas–liquid reaction: Morphology and size distribution of particles in Couette-Taylor and stirred tank reactors. **J. Cryst. Growth**, v. 312, p. 3331–3339, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2010.08.026>
- [23] BAHROM, H.; GONCHARENKO, A.A.; FATKHUTDINOVA, L.I. et al. Controllable Synthesis of Calcium Carbonate with Different Geometry: Comprehensive Analysis of Particle Formation, Cellular Uptake, and Biocompatibility. **ACS Sustainable Chem. Eng.**, v. 7, p. 19142–19156, 2019. <http://doi:10.1021/acssuschemeng.9b05128>
- [24] AL-HASHEMI, H.M.B.; AL-AMOUDI, O.S.B. A review on the angle of repose of granular materials. **Powder Technology**, v. 330, p. 397-417, 2018. <http://doi:10.1016/j.powtec.2018.02.003>
- [25] TANK, D.; KARAN, K.; GAJERA, B.Y. et al. Investigate the effect of solvents on wet granulation of microcrystalline cellulose using hydroxypropyl methylcellulose as a binder and evaluation of rheological and thermal characteristics of granules. **Saudi Pharm. J.**, v. 26, p. 593-602, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.02.007>
- [26] PISHNAMAZI, M.; CASILAGAN, S.; CLANCY, C. et al. Microcrystalline cellulose, lactose and lignin blends: Process mapping of dry granulation via roll compaction. **Powder Technology**, v. 341, p. 38-50, 2019. <http://doi:10.1016/j.powtec.2018.07.003>

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

[27] SAKR, W.F.; IBRAHIM, M.A.; ALANAZI, F.K. et al. Upgrading wet granulation monitoring from hand squeeze test to mixing torque rheometry. **Saudi Pharm. J**, v. 20, p. 9-19, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2011.04.007>

CAPÍTULO IV

**Perfil de dissolução de comprimidos de cálcio consumidos como
suplemento alimentar**

PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE CÁLCIO CONSUMIDOS COMO SUPLEMENTO ALIMENTAR

RESUMO

A suplementação de cálcio é um importante recurso para prevenção da osteoporose, uma vez que a baixa ingestão deste mineral é uma situação comum em todo o mundo. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar se o perfil de dissolução de comprimidos de cálcio disponíveis no mercado farmacêutico brasileiro são semelhantes. Foram avaliados sete produtos do mercado farmacêutico e, adicionalmente, uma formulação produzida em nosso laboratório contendo carbonato de cálcio proveniente da alga marinha *Lithothamnium calcareum*. Além do ensaio de dissolução, os comprimidos foram caracterizados por intermédio de outros ensaios, tais como o peso médio, dureza, tempo de desintegração e teor. Para complementar, buscamos determinar as formas polimórficas do cálcio presentes nos comprimidos, por intermédio da difração de raios-x. Os resultados obtidos mostraram que os produtos apresentam várias diferenças entre si, notadamente em relação a dissolução, desintegração, formas polimórficas e teor de cálcio. Por outro lado, a formulação contendo carbonato de cálcio oriunda da alga *Lithothamnium calcareum* se destacou pelo seu perfil de dissolução. Assim, é possível que os produtos não sejam equivalentes e é recomendado a reavaliação de alguns produtos, bem como uma reavaliação dos processos de fabricação desses suplementos.

Palavras-chave: perfil de dissolução, carbonato de cálcio, citrato de cálcio, *Lithothamnium calcareum*, osteoporose

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, com o envelhecimento da população registrado em quase todo o mundo, questões importantes, como a saúde dos ossos tem despertado crescente interesse e a suplementação de cálcio está no centro deste debate.¹

A deficiência de cálcio é proveniente de uma ingestão inadequada de leite, derivados de leite e outras fontes de alimentos contendo o mineral. Nessa situação, a administração de cálcio é necessária para enriquecer a dieta com baixa ingestão alimentar desse nutriente e principalmente para prevenção da osteoporose.^{2,3}

A osteoporose é considerada pela International Osteoporosis Foundation,¹ como uma doença em que a densidade e qualidade óssea são reduzidas, tornando os ossos porosos e frágeis podendo causar fraturas, que, dependendo do tipo e local, podem resultar em graves consequências, principalmente em idosos. Assim, é aconselhável a adoção de medidas preventivas para que os ossos se fortaleçam, dentre as quais a suplementação de cálcio na dieta alimentar.

Entretanto, o que se verifica é que a ingestão média de cálcio na dieta (mg / d) é baixa no mundo inteiro, especialmente na América do Sul onde a população consome em média 400-600 mg/d⁴ diante de uma indicação de 1000 mg/ dia para um adulto de 19-50 anos.¹

Como consequência dos avanços em pesquisas, as opções terapêuticas para combater a osteoporose foram aumentando e temos disponíveis dentre eles, os suplementos alimentares de cálcio na forma farmacêutica de comprimidos revestidos ou mastigáveis.^{5,6} Entretanto, o cálcio na suplementação alimentar pode ser proveniente de diversas fontes, como por exemplo, o carbonato de cálcio (CaCO₃) biogênico, podendo ser representada pela alga marinha *Lithothamnium calcareum* (*L. calcareum*), o CaCO₃ de ostras, e o CaCO₃ mineral, o mais tradicional. Além disso, o CaCO₃ contém um elevado teor de cálcio elementar (Ca⁺⁺) de 40%, em comparação com outros sais de cálcio.^{7,8}

Uma ingestão diária de cálcio (700 – 1.200 mg/dia) concomitantemente à administração de uma dose de 800 UI ou mais de vitamina D para indivíduos com

idade acima de 50 anos, é recomendada para prevenção de fraturas. Esta combinação também é importante para pacientes com risco elevado de fraturas e que fazem uso de medicamentos para tratar a osteoporose, tais como os bisfosfonatos.⁹ Apesar de certa controvérsia, é consenso que esta associação cálcio-vitamina D é realmente útil para casos de deficiência e para aqueles que estão em tratamento de osteoporose.¹⁰

No entanto, a dissolução de cálcio a partir destas formulações pode representar um obstáculo para a absorção deste por parte do organismo. Esta questão foi estudada por Brennan e colaboradores,¹¹ que, ao avaliar amostras de 27 produtos contendo cálcio comercialmente disponíveis nos EUA, foi verificado que, destes, 67% não apresentavam dissolução adequada. Entretanto, são poucos estudos que abordaram a questão de perfil de dissolução de produtos contendo cálcio.^{12,13}

Diante desse quadro, o objetivo do presente trabalho é avaliar se o perfil de dissolução de comprimidos de cálcio disponíveis no mercado farmacêutico brasileiro são semelhantes. Adicionalmente, os perfis serão comparados com uma formulação de carbonato de cálcio proveniente da alga marinha *Lithothamnium calcareum*, produzida experimentalmente em nosso laboratório.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foram adquiridas 7 amostras de comprimidos de cálcio de diferentes fabricantes em drogarias da cidade de São Paulo e identificadas conforme apresentado na Tabela 4.1. Adicionalmente, foi testada uma formulação de carbonato de cálcio (500 mg de cálcio elementar) proveniente da alga marinha *Lithothamnium calcareum*, produzida em nosso laboratório de Desenvolvimento e Inovação Farmacotécnica (Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo) por tecnologia de granulação úmida.

Tabela 4.1 – Amostras contendo diferentes sais de cálcio adquiridos no mercado na forma de comprimidos para o estudo de dissolução.

Amostras	Tipo de cálcio	Cálcio por comprimido (mg) / vitamina D ₃ (UI)	Prazo de validade
<i>L. calcareum</i>	carbonato de cálcio	500 / 200	-
A	carbonato de cálcio de ostras	500 / 200	out/17
B	carbonato de cálcio	600 / 400	dez/17
C	carbonato de cálcio de ostras	500	fev/18
D	citrato malato de cálcio	500 / 200	dez/18
E	carbonato de cálcio	600 / 200	dez/18
F	citrato de cálcio	600 / 200	fev/19
G	citrato malato de cálcio	250 / 200	ago/17

2.2 Reagentes

A quantificação do cálcio foi determinada comparando com um padrão de teor 99% (Dinâmica[®] Química, São Paulo, Brasil). Os reagentes de grau analítico utilizados foram o ácido clorídrico (LabSynth, São Paulo, Brasil), hidróxido de sódio (LabSynth, São Paulo, Brasil), edetato dissódico (Merck, Darmstadt, Alemanha), filtros cânula porosos de 45 microns de polietileno UHMW (Quality Lab Accessories, Pensilvânia, EUA) - empregado na filtração das alíquotas dos ensaios de dissolução, água ultrapurificada (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) e azul de hidroxinaftol (Dinâmica[®] Química, São Paulo, Brasil).

2.3 Descrição dos comprimidos de cálcio e caracterização

Os comprimidos foram avaliados visualmente (a olho nú) e descrito as suas características externas, tais como cor, odor, formato do comprimido, aspecto da superfície, se revestido ou não revestido.

As amostras foram caracterizadas com base nos métodos aplicados às formas farmacêuticas descritas na Farmacopeia Brasileira.¹⁴ Os parâmetros selecionados foram o peso médio, teste de dureza, espessura, diâmetro e teste de desintegração. Os resultados foram expressos a partir da média e \pm desvio padrão.

2.4 Difração de raios-x

As análises por difração de raios X por pó foram conduzidas em difratômetro Panalytical Empyrean (Malvern Instruments, UK), disponível no Laboratório de Caracterização Tecnológica (Escola Politécnica da Universidade de São Paulo). Foi selecionado o recipiente de pulverização planetário aço-cromo (seco) e os parâmetros instrumentais empregados foram radiação de Cu obtida com tensão de 45 e corrente de 40 (KV/mA), intervalo angular analisado de 2° a 65° (2 θ) em passo angular de 0,02° (2 θ), tempo por passo de 150 segundos. Os dados foram coletados em modo de reflexão em geometria Bragg-Brentano.

Para a identificação dos polimorfos foram utilizadas as bases de dados *The Cambridge Structural Database*[®] (CSD) e *Inorganic Crystal Structure Database*[®] (ICSD) para acesso aos modelos estruturais (*Crystallographic Information Framework - CIF*). A confirmação da fase polimórfica e a quantificação das fases presentes ocorreu por meio do refinamento pelo método de Rietveld,¹⁵ que foi realizado usando o programa TOPAS-Academic V7,¹⁶ em que foram refinados parâmetros de rede das células unitárias, tamanho de cristalito e o background foi ajustado usando a função polinomial de Chebyshev com 8 termos. As estruturas utilizadas durante o refinamento obtidas na base de dados mencionada podem ser encontradas com os códigos ICSD 40109 (Calcita magnesiana), 252901 (aragonita), 150 (calcita), 21017 (talco), 248960 (brucita) e código CSD LACTOS01 (α -Lactose).

2.5 Instrumentação e metodologia

2.5.1 Teor de cálcio

A quantificação do cálcio presente nos comprimidos foi realizada conforme preconizado pela Farmacopeia Americana.¹⁷ Para a medição foi empregado uma bureta digital (Bürette II, Gerbershausen, Germany) e selecionado um filtro

quantitativo de $18,50 \pm 0,15$ cm (Framex[®], Blumenau, Brasil) de velocidade de filtração média (140 segundos). Os reagentes foram preparados conforme descrito no método farmacopeico e o conteúdo do cálcio foi expresso em mg e porcentagem da quantidade teórica.

2.5.2 Quantificação do cálcio no ensaio de dissolução

A quantificação do cálcio dissolvido foi realizada em equipamento de espectrometria de absorção atômica (Varian SpectrAA 50B, California, EUA) no Laboratório de Química Analítica (Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo). Os parâmetros instrumentais aplicados foram a pressão de ar acetileno 1,5 bar, pressão de ar comprimido em 3 bar, a intensidade de corrente (40 mA) da lâmpada de cátodo (Photron Hollow-HAG0054, Victoria Austrália), ajustes manuais da altura do queimador, abertura da fenda (slit) de 1,0 e comprimento de onda de 422 nm.

2.5.3 Linearidade

Uma solução-padrão de cálcio foi preparada na concentração de 1000 µg/mL, em triplicata. Na sequência foram realizadas diluições nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 150, 200 µg/mL, quantificadas e os resultados foram analisados em software Action Stat[®] (versão 3.7, Portal Action, Brasil). A significância do modelo do teste F da ANOVA (método dos mínimos quadrados ponderados), detectou na linearidade de cálcio o p-valor (0), ou seja, < que 0,05 ao nível de significância de 5%. O teste do intercepto constatou um resultado igual a zero e coeficiente de determinação (R^2) = 0,998. A partir desses resultados consideramos a equação da reta nos cálculos da quantificação das amostras no ensaio de dissolução.

2.6 Ensaios de dissolução

Os ensaios de dissolução das amostras (triplicata) foram conduzidos em equipamento 708-DS Dissolution Apparatus (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EUA). Os parâmetros selecionados estão descritos na Tabela 4.2 e as coletas foram determinadas em intervalos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos, sem reposição de

meio, e em seguida as alíquotas foram submetidas à filtração em filtros cânula porosos de 45 microns de polietileno UHMW (Quality Lab Accessories, Pensilvânia, EUA). Na sequência, o cálcio foi quantificado com diluições de 4 a 30 vezes em espectrofotômetro de absorção atômica.

Tabela 4.2 - Condições empregadas nos ensaios de dissolução de cálcio¹⁷

Parâmetros	Condições
Aparato	2 (pá)
Meio de dissolução	HCl 0,01 N
Volume do meio	750 mL
Temperatura	37 °C ± 0,5 °C
Velocidade de agitação	75 rpm
Tempo de ensaio	60 minutos
Volume da alíquota	5 mL
Método de quantificação	espectrômetro (422 nm)

A partir dos resultados obtidos foram construídos os perfis de dissolução empregando o software Microsoft Excel. A eficiência de dissolução (ED) foi calculada com o auxílio do suplemento do Microsoft Excel Ddsolver, descrito por ZHANG e colaboradores¹⁸ e o parâmetro mencionado foi calculado pela seguinte equação.¹⁹

$$E.D. = \int_0^t y \times dt \times 100\% \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

y = porcentagem do fármaco dissolvido no tempo t.

2.6.1. Análise estatística

Inicialmente foi realizada análise de componentes principais (ACP), levando em consideração os dados de dureza, desintegração, teor e os valores de porcentagem dissolvida nos tempos de 15 min ($Q\%_{15\text{min}}$) e 45 min ($Q\%_{45\text{min}}$), além da eficiência de dissolução (ED). Para isso foi utilizado o programa Statistica 13.5.0.17 (TIBCO® Software Inc., Tulsa, Estados Unidos) e após padronização dos dados, novas variáveis foram criadas e aquelas com maiores autovalores (CP1 e CP2) foram selecionadas para a construção dos gráficos bidimensionais.

Para efeito comparativo, análise de variância (ANOVA) foi realizada com os dados de ED, sendo as formulações agrupadas utilizando teste de Tukey. A suposição de normalidade dos dados foi testada pelo método de Anderson-Darling, havendo necessidade de transformação destes pela aplicação do modelo de Johnson. Para essas análises foi utilizado o programa Action Stat versão 3.6.331.450 build 7 – 2019 (Estatcamp, São Carlos, Brasil).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização das amostras

Quanto ao aspecto visual, os comprimidos de cálcio se apresentaram sem defeitos aparentes, com formato variado e revestidos ou não, conforme descrito na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Aspecto visual dos comprimidos de cálcio e da formulação contendo *L. calcareum*.

Produto	Cor	Formato	Aspecto	Forma farmacêutica
<i>L. calcareum</i>	creme	circular, sem vinco de divisa	faces lisas, pouco brilho, arestas arredondadas	Comprimido mastigável
A	branco	elípticos, sem vinco de divisa	faces lisas, com brilho, arestas arredondadas	Comprimido revestido
B	branco	circular, sem vinco de divisa	faces opacas, arestas arredondadas	Comprimido mastigável
C	verde claro	oblongo, sem vinco de divisa	faces lisas, com brilho, arestas arredondadas	Comprimido revestido
D	creme	oblongo, com vinco de divisa	faces lisas, com brilho, arestas arredondadas	Comprimido revestido
E	branco	oblongo, sem vinco de divisa	faces lisas, com brilho, arestas arredondadas	Comprimido revestido
F	branco	oblongo, sem vinco de divisa	faces opacas, sem brilho, arestas arredondadas	Comprimido convencional
G	rosa	oblongo, com vinco de divisa	faces lisas, com brilho, arestas arredondadas	Comprimido revestido

Com relação aos resultados apresentados na Tabela 4.4, notamos que o menor peso correspondeu ao comprimido na forma de citrato (F) e o peso mais elevado (B) apresentou, também, a maior quantidade de cálcio (correspondente a 600 mg). Curiosamente, se destacou o peso do produto G, que contém apenas 250 mg de cálcio sob a forma de citrato malato.

O peso, tamanho e, conseqüentemente, o volume dos comprimidos pode representar um desconforto considerável para o paciente quando da sua ingestão, o que pode impactar, inclusive, na adesão ao tratamento.

Tabela 4.4 – Peso médio (g), dureza (Kgf), espessura (cm), diâmetro (cm), tempo de desintegração (minutos), teor de Ca⁺⁺ (mg) e teor de Ca⁺⁺ e (%), com dados expressos em média ± desvio padrão.

Produto	Peso médio n = 20	Dureza n = 10	Espessura n = 20	Diâmetro n = 20	Tempo de desintegração n = 6	Teor de Ca ⁺⁺ n = 9	% de Ca ⁺⁺ n = 9
<i>L. calcareum</i> *	1,770 ± 0,300	8,00 ± 0,20	0,610	1,200	0'39" ± 0'01"	529,42	106,01
A*	1,686 ± 0,049	25,67 ± 0,93	0,482	1,938	6'24" ± 0'12"	538,65	107,73
B**	1,923 ± 0,009	6,50 ± 0,11	0,51	1,990	0'12" ± 0'01"	602,06	100,34
C*	1,579 ± 0,030	20,50 ± 0,17	0,511	1,730	17'32" ± 0'09"	562,82	112,56
D*	1,591 ± 0,031	18,70 ± 0,79	0,765	2,160	9'63" ± 0'32"	434,39	86,87
E**	1,789 ± 0,029	13,20 ± 1,47	0,613	1,944	1'68" ± 0'61"	605,87	100,97
F**	1,262 ± 0,013	14,57 ± 1,06	0,587	1,685	0'27" ± 0'02"	578,21	96,36
G***	1,884 ± 0,022	8,87 ± 1,35	0,468	1,722	14'00" ± 0'35"	255,48	102,19

*500 mg; **600 mg; ***250 mg

O tempo de desintegração, independentemente dos valores de dureza, variou de 12 segundos a 14 minutos. As formulações de liberação imediata devem ser desenvolvidas para se desintegrar de forma rápida no fluido gástrico e os produtos C, D e G demandaram um tempo maior de desintegração, ultrapassando 9 minutos, chegando a 14 minutos no caso do produto G. Por outro lado, se destacaram as formulações de *L. calcareum*, B e F, com tempos inferiores a 1 minuto

Para o teor de cálcio nos comprimidos, verificamos uma variação considerável entre as formulações. Para respeitar o especificado pela Farmacopeia Americana,¹⁷ os valores de cálcio dos produtos deveriam se situar entre 90 – 110%, entretanto, D contém 86,87 e C, 112,56% do total de cálcio especificado. Nestes casos, é importante que as empresas revisem seus procedimentos para se adequarem ao recomendado.

3.2 Difração de raios-x por pó

Para as amostras *L. calcareum*, A, B, C, E e F foi possível realizar o refinamento das estruturas cristalinas e a quantificação das fases cristalinas presentes, uma vez que todas as fases puderam ser identificadas e suas estruturas obtidas nos bancos de dados descritos no item 2.4 (Figura 4.1 e Tabela 4.5).

As amostras D e G apresentam uma mistura de diversas fases, com sobreposição de picos elevada, o que resultou na impossibilidade de identificação. Cabe ressaltar que estas duas amostras apresentam quantidade significativa de fase amorfa, dada a elevada linha de base que pode ser vista na Figura 4.2. Pelo fato de ambas as amostras apresentarem picos alargados e sem características definidas, isso pode indicar ausência de cristalinidade.^{20,21}

Figure 4.1: Gráfico de Rietveld para as amostras de 1: *Lithothamnium* ($R_{wp} = 9,38\%$, $gof = 1,98$), 2 ($R_{wp} = 10,63\%$, $gof = 2,04$), 3 ($R_{wp} = 7,44\%$, $gof = 2,40$), 4 ($R_{wp} = 13,55\%$, $2,59$), 5 ($R_{wp} = 12,99\%$, $gof = 2,50$) and 6 ($R_{wp} = 7,72\%$, $gof = 1,68$).

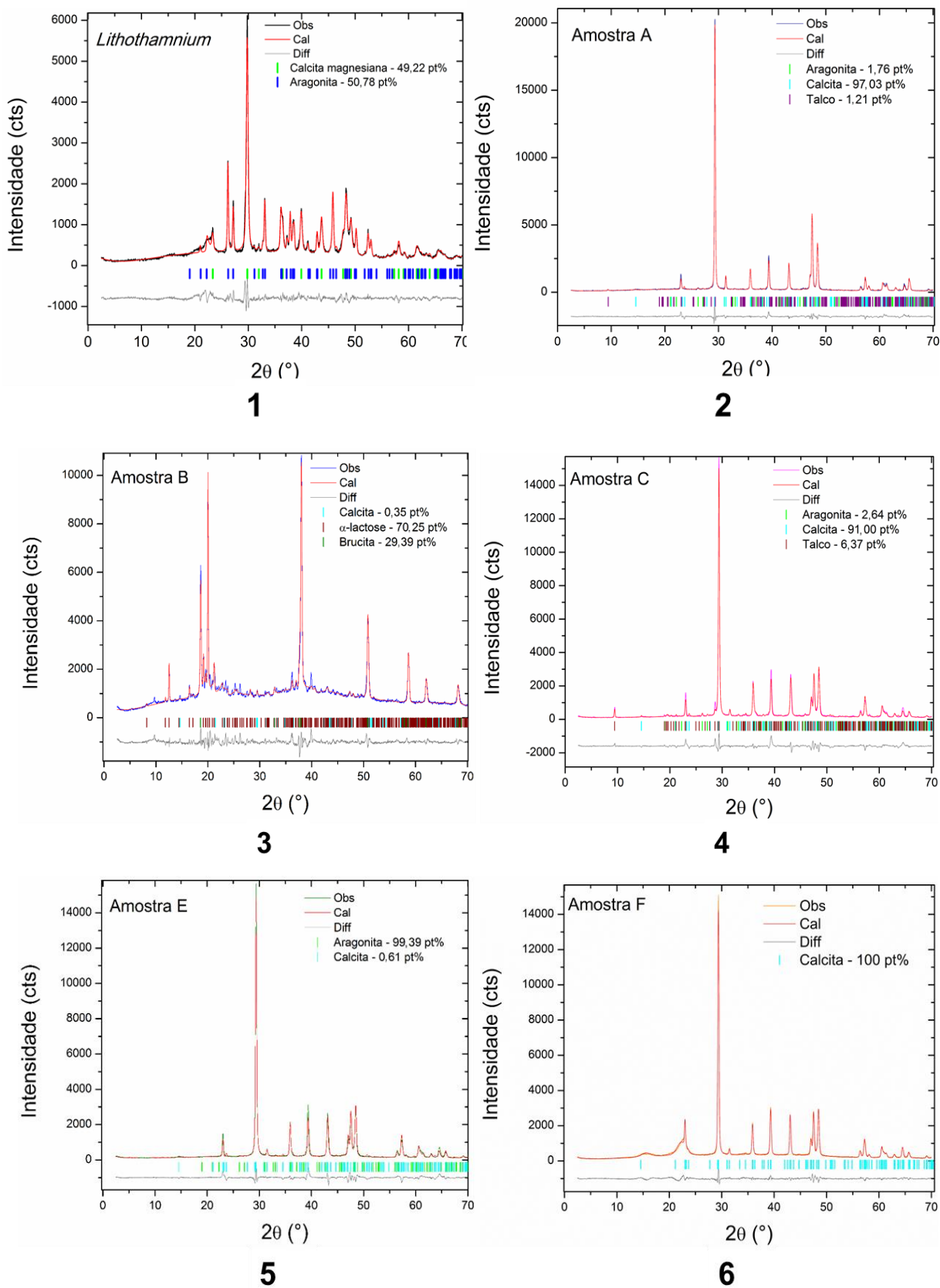
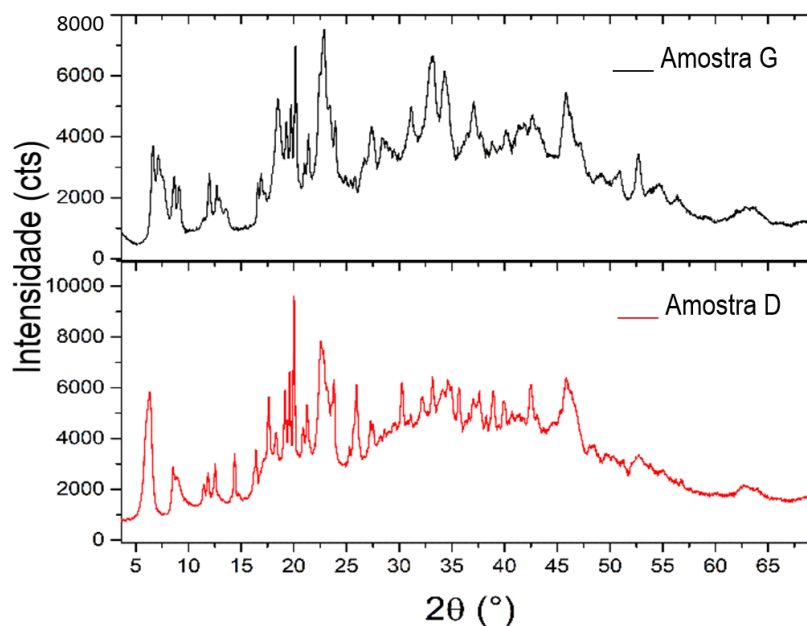


Figure 4.2: Padrões para as amostras D e G..**Tabela 4.5** – Distribuição das fases cristalinas em porcentagem \pm desvio padrão para cada produto.

Produto	Fases cristalinas e proporção em massa (pt%)
<i>L. calcareum</i>	Aragonita ($50,8 \pm 6,0$) e calcita magnésiana ($49,2 \pm 6,0$)
A	Aragonita ($1,8 \pm 3,0$), calcita ($97,0 \pm 4,0$) e talco ($1,2 \pm 3,0$)
B	Calcita ($0,3 \pm 2,0$), alpha-lactose ($69,7 \pm 2,0$) e brucita ($30,0 \pm 2,0$)
C	Aragonita ($2,6 \pm 4,0$), calcita ($91,0 \pm 5,0$) e talco ($6,4 \pm 3,0$)
D	Não determinado
E	Aragonita ($0,6 \pm 3,0$) e calcita ($99,4 \pm 3,0$)
F	Calcita (100%)
G	Não determinado

As fases cristalinas nas proporções aragonita-calcita são típicas de amostras biogênicas, ou seja, amostras provenientes do oceano,²² o que corresponde ao indicado nos produtos A e C, além da formulação de *L. calcareum*. Porém, o produto

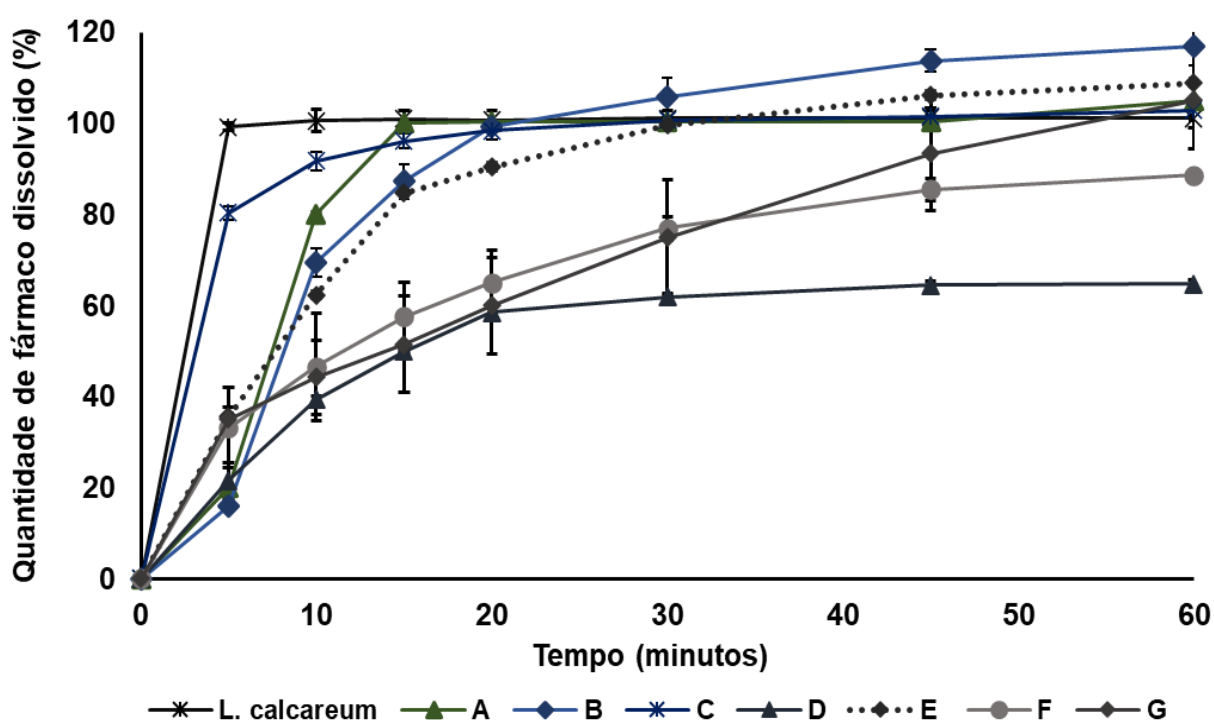
aqui designado como E indicou pequena proporção de aragonita, sem, no entanto, qualquer menção da sua origem marinha pelo fabricante.

É interessante observar que a aragonita é a fase dominante em *L. Calcareum*, o que pode representar uma vantagem interessante, pois essa fase é metaestável e muito mais solúvel se comparado com calcita magnesiana que é termodinamicamente estável.²³ Ao contrário, o produto F, com 100% de calcita aparece em desvantagem com relação à solubilidade do cálcio.

3.3 Dissolução

Os perfis de dissolução dos comprimidos de cálcio e da formulação de *L. calcareum* (Figura 4.3), indicaram um comportamento bastante distinto entre os produtos. É possível observar que a formulação contendo *L. calcareum* se destacou, com uma liberação rápida de cálcio, que dissolveu em apenas 10 minutos de ensaio, seguido pelos produtos designados como C, A, B e E.

Figura 4.3 – Perfis de dissolução das amostras de cálcio e *L. calcareum*. Os valores correspondem a média de 3 determinações para cada amostra e as barras representam o desvio padrão.



Por outro lado, os demais produtos (D, F e G) apresentaram-se mais distanciados, sendo D e F aqueles com acentuada deficiência na dissolução do cálcio. A questão a ser discutida é: porque estes produtos manifestaram tal comportamento? Para o produto D, a resposta pode estar ligada a dois aspectos: o elevado tempo de desintegração ($9'63 \pm 0'32''$) e o baixo teor de cálcio (86,87%). O produto F, em contraste, apresentou um tempo de desintegração de apenas 12 segundos, porém, com valores de ED de 68% e TMD de $13,927 \pm 0,92$ minutos, que são desfavoráveis. Ou seja, nesse caso, o comprimido é capaz de se desfazer muito rapidamente, no entanto, o cálcio nele contido não se dissolve na mesma proporção. Isso pode ser atribuído, então, às características da matéria prima, nesse caso, o citrato de cálcio incluído na formulação.^{24,25}

O produto G apresentou, claramente, uma deficiência no seu tempo de desintegração (14 minutos), o mais elevado dentre todos os produtos aqui estudados. É provável que os excipientes empregados no desenvolvimento da formulação, em especial o aglutinante,²⁶ tenha influenciado na desintegração do comprimido. A falta ou a quantidade insuficiente de um desintegrante, também pode contribuir para este fraco desempenho.²⁷

É importante destacar que os produtos estudados continham diferentes sais de cálcio e, portanto, a hipótese de que os sais presentes são os responsáveis por esse comportamento deve ser considerada. Cartensen e colaboradores,²⁸ demonstrou em seus estudos que os sais de cálcio não apresentaram a mesma dissolução. Contudo, pôde concluir que de fato, os dados de dissolução *in vitro* de diferentes sais de cálcio apresentaram resultados semelhantes quando comparados com os resultados *in vivo* (biodisponibilidade). Mesmo que esses dados tenham sido para os sais de cálcio e não para dosagem, tais conclusões dos autores corroboram com os dados aqui apresentados. Logo, para os produtos de diferentes sais de cálcio aqui estudado, podemos atribuir que as diferenças dependem das características de cada formulação.

Os valores descritos na Tabela 4.6 são provenientes da média da porcentagem de cálcio dissolvido. No entanto, não identificamos semelhanças ao avaliar os resultados. Em consequência disso, quanto $>AUC$ e $>\%ED$ dos valores registrados das formulações, $<TMD$ alcançado. Nessa situação, as formulações que mais se

aproximaram de *L. calcareum* foram as amostras C e B, que obtiveram valores de %ED >90 com uma rápida liberação do cálcio.

Tabela 4.6 – Média de cálcio dissolvido (%), tempo médio de dissolução (TMD_{min}), porcentagem da eficiência de dissolução (ED) e \pm desvio padrão.

Formulações	cálcio dissolvido	TMD	ED
<i>L. calcareum</i>	101,05 \pm 2,15	2,612 \pm -0,127	96,65
A	104,97 \pm 3,16	9,489 \pm 1,038	88,36
B	116,98 \pm 4,32	12,876 \pm 0,742	91,87
C	102,84 \pm 2,42	5,237 \pm 2,092	93,86
D	64,73 \pm 0,96	10,274 \pm 0,744	53,64
E	108,87 \pm 0,16	11,822 \pm 0,930	87,41
F	88,56 \pm 6,01	13,927 \pm 0,921	68,00
G	105,04 \pm 10,77	19,761 \pm 0,756	70,44

TMD = tempo médio de dissolução

ED = eficiência de dissolução

3.4 Análise estatística

3.4.1 Componentes principais

Na Figura 4.4, é possível observar que pela distribuição apresentada notamos que as duas novas variáveis criadas (ACP1 e ACP2) foram capazes de reter 84,01% da informação original contida nos fatores de entrada (dureza, desintegração, teor, Q%_{015min}, Q%_{045min} e ED). A partir desses dados, notamos que em relação à ACP1, as amostras são aproximadas em função dos resultados decorrentes da dissolução (Figura 4.5). As amostras que tiveram liberação mais baixa (F e D), ou mais lenta, como no caso da formulação G, ficaram mais próximas.

Em relação à ACP2, dureza e desintegração mostraram maior influência no agrupamento das amostras. Entretanto, como demonstrado na Tabela 4.7, a presença

de revestimento parece influenciar na desintegração e dureza dos comprimidos. Outro aspecto que chama atenção é em relação ao tipo de sal, uma vez que ao analisar a divisão proporcionada pela ACP1, todas as amostras localizadas à esquerda, contém carbonato de cálcio, enquanto aquelas localizadas na porção direita, citrato ou citrato malato. O isolamento da formulação D se dá muito provavelmente por conta do teor mais baixo.

Figura 4.4: A: Gráficos de componentes principais: A - distribuição das amostras para comparação. B - gráfico bidimensional de componentes principais. Ambos os Fatores 1 e 2 correspondem a 84,01% das informações contidas nas variáveis originais.

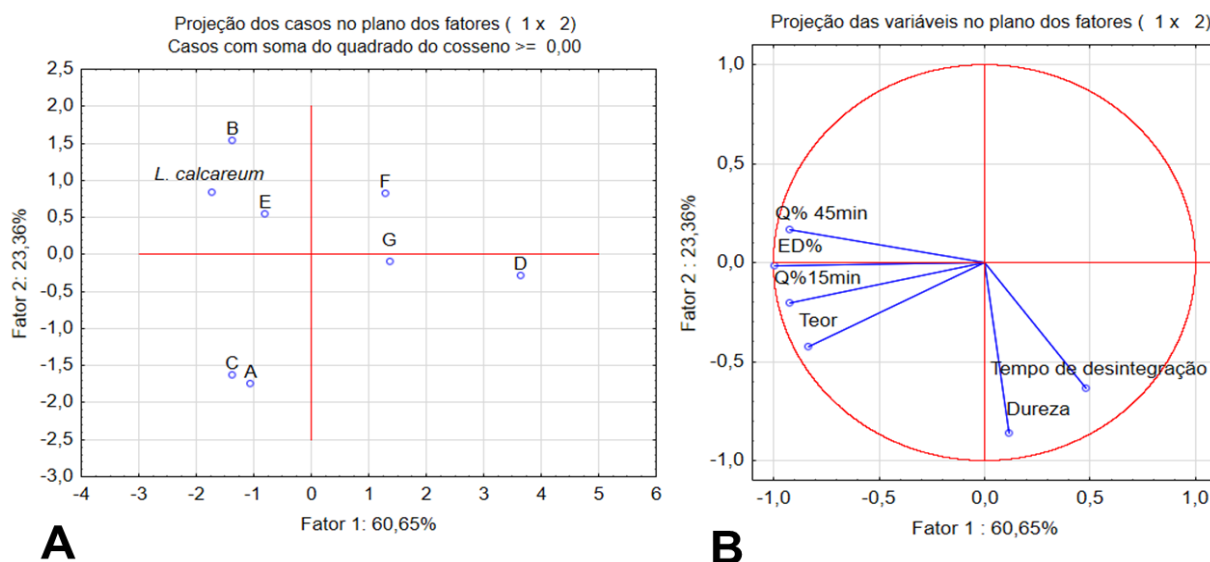


Tabela 4.7 - Apresentação dos 4 grupos sugerida pela ACP.

Produto	Tipo de sal	Dose	Revestimento	Dureza	Tempo de desintegração	Teor	Q%15min	Q%45min	ED%
<i>L. calcareum</i>	carbonato	500	não	8	39	106,01	100,9	101,3	96,9
B	carbonato	600	não	6,5	12	100,34	87,2	113,8	91,9
E	carbonato	600	sim	13,2	128	100,97	84,6	106,2	87,4
A	carbonato	500	sim	25,87	384	107,73	100,1	100,5	88,4
C	carbonato	500	sim	20,5	553	112,56	96,2	101,6	93,9
F	citrate	600	não	14,57	27	96,36	57,6	85,4	68
G	citrate malate	250	sim	8,87	840	102,19	51,4	93,3	70,4
D	citrate malate	500	sim	18,7	603	86,87	50	64,4	53,6

3.4.2 Análise de variância e Teste de Tukey

Para avaliação da normalidade dos dados e realização da ANOVA (Tabela 4.8), o teste de Anderson-Darling foi realizado, sendo obtido um P-valor de 0,0009. Ao considerar um nível de significância de 5%, dado o baixo valor obtido (menor que 0,05), se fez necessária a transformação prévia dos dados. Após a aplicação do modelo de Johnson, foi realizado um novo teste, resultando em valor de P-valor mais elevado (0,5363), atestando assim, a normalidade.

Tabela 4.8 - ANOVA para os resultados de ED.

	<i>G.L.</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
A	7	17,84527901	2,549325573	56,79484701	4,08381E-10
Resíduos	16	0,718185035	0,044886565		

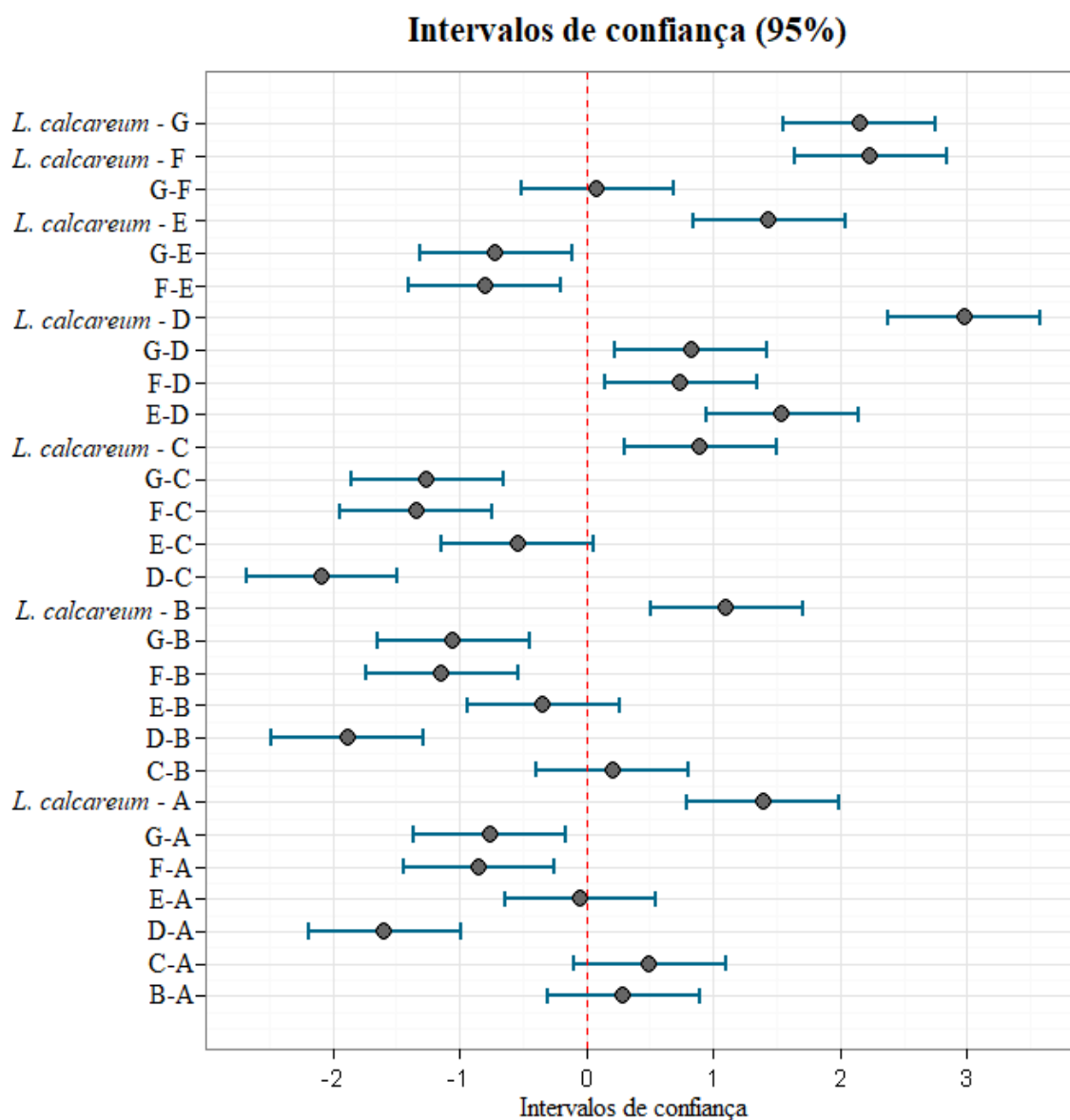
De acordo com o P-valor obtido na ANOVA, verifica-se que a hipótese nula é rejeitada ($p < 0,05$), mostrando que há diferenças na liberação do cálcio a partir dos diferentes comprimidos, como também apresentado pelo gráfico dos perfis de dissolução. Com o teste de Tukey, é possível fazer o agrupamento e entender onde essa diferença está situada.

Conforme a Tabela 9 e Figura 5, quatro grupos foram criados, com resultado muito semelhante à análise de ACP, a única diferença está na separação do *L. calcareum* das demais amostras. Isso se deve às respostas adotadas para cada análise, pois na ACP, outros pontos foram considerados, como por exemplo a $Q\%_{15min}$. Assim, ao considerar as duas análises entendemos que os grupos a e b, podem ser consideradas como um só.

Tabela 4.9 - Agrupamento das amostras resultante da aplicação do Teste de Tukey

Fator	Médias	Grupos
<i>L. calcareum</i>	1,5788332	a
C	0,6823426	b
B	0,4776333	b
A	0,1867316	b
E	0,1391148	b
G	-0,5736842	c
F	-0,6598795	c
D	-1,4022136	d

Figura 5: Intervalos de confiança (95) de Tukey em função dos resultados de ED.



Portanto, a partir da análise estatística aqui executada, o que se verifica é que os produtos estão nitidamente divididos em grupos. Os produtos podem não ser equivalentes e o consumidor deveria ser alertado sobre este fato quando da substituição destes produtos. Ademais, alguns se apresentaram falhos em relação a dissolução (produtos D, F e G) e teor (produto D e F).

4. CONCLUSÃO

Produtos com desintegração muito rápida e, outros com um tempo de desintegração mais elevado coexistem simultaneamente no mercado e são encontrados, também, produtos com teor de cálcio fora das especificações estabelecidas pela Farmacopeia Americana. São encontrados, ainda, produtos com diferentes formas polimórficas de cálcio e se constata que os comprimidos de *L. calcareum* contém quantidades predominante de aragonita, que é a forma mais solúvel de cálcio.

A formulação de *L. calcareum* se destaca neste trabalho, e exibe um perfil de dissolução bastante superior, provavelmente em função da presença da aragonita em elevada concentração.

Por outro lado, a análise estatística dos perfis de dissolução mostra a existência de diferentes grupos, que varia desde produtos com destacado perfil até produtos com acentuada deficiência na liberação do cálcio.

Portanto, dada a situação aqui descrita, é importante alertar ao consumidor de suplemento de cálcio que os produtos que se encontram no Brasil não são, necessariamente, equivalentes. Em contrapartida, os fabricantes de tais produtos, em alguns casos, devem rever seus produtos e seus processos de fabricação na tentativa de melhorar alguns importantes aspectos de qualidade.

5. REFERÊNCIAS¹

- [1] INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, Osteoporosis, 2020. Switzerland. <https://www.iofbonehealth.org/what-is-osteoporosis>. Acesso em 14/08/2020.
- [2] HEIDARI, B; HAJIAN-TILAKI, K; BABAEI, M. Effectiveness, and safety of routine calcium supplementation in postmenopausal women. A narrative review. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, Issue 4, p. 435-442, July–August 2020. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.016>
- [3] CAPOZZI, A.; SCAMBIA, G.; LELLO, S. Calcium, vitamin D, vitamin K2, and magnesium supplementation and skeletal health. **Maturitas**, v. 140, p. 55-63, outubro de 2020. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2020.05.020>
- [4] BALK, E.M.; ADAM, G.P.; LANGBERG, V.N. et al. Global dietary calcium intake among adults: a systematic review. **Osteoporos Int.**, v. 28, p. 3315–3324, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00198-017-4230-x>
- [5] LANGDAHL, B.L. New treatments of osteoporosis. **Osteoporosis and Sarcopenia**. v. 1, p. 4-21, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.afos.2015.07.007>
- [6] GOLOB, A.L.; LAYA, M.B. Osteoporosis Screening, Prevention and Managment. **Rev Med Clin N Am.** v. 99, p. 587–606, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2015.01.010>
- [7] AL OMARI, M.M.H.; RASHID, I.S.; QINNA, N.A. et al. Calcium carbonate. Chapter Two. **Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology**, v.41, p. 31-132, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.podrm.2015.11.003>
- [8] HICKMAN, G.J.; BELTON, D.J.; NEWICK, R. et al. Barriers to adoption of biogenic carbonates in the food, pharmaceutical & supplement sectors. **NFS Journal**, v. 16, p. 1-8, September 2019. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2019.05.002>
- [9] FÖGER-SAMWALD, U.; DOVJAK, P.; AZIZI-SEMRAD, U. et al. Review: Osteoporosis: pathophysiology and therapeutic options. **EXCLI Journal**, v.19, p.1017-1037, 2020. <http://dx.doi.org/10.17179/excli2020-2591>
- [10] HARVEY, N.C.; BIVER, E.; KAUFMAN, J-M. et al. The role of calcium supplementation in healthy musculoskeletal ageing. **Osteoporos Int**, v. 28, p.447–462, 2017. [DOI 10.1007/s00198-016-3773-6](https://doi.org/10.1007/s00198-016-3773-6)

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- [11] BRENNAN, M. J.; DUNCAN, W. E.; WARTOFSKY, L. et al. *In vitro* dissolution of calcium carbonate preparations. **Calcif Tissue Int.** v. 49, p. 308-312, 1991. <https://doi:10.1007/BF02556251>
- [12] CARR, C.J. and SHANGRAW, R.F. Nutritional and Pharmaceutical Aspects of Calcium Supplementation. *American Pharmacy*, v. 27(2), p.49-56, 1987. [doi: 10.1016/s0160-3450\(15\)32077-8](https://doi:10.1016/s0160-3450(15)32077-8)
- [13] SHEIKH, M.S. and FORDTRAN, J.S. Calcium bioavailability from two calcium carbonate preparations. *N Engl J Med*, v.27;323(13):921, 1990. [doi: 10.1056/NEJM199009273231319](https://doi:10.1056/NEJM199009273231319)
- [14] FARMACOPEIA Brasileira. 6^a ed, volume 1, Brasília, 2019.
- [15] RIETVELD, H. M. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures, *J Appl Crystallogr*, v. 2 (2), p. 65-71, June 1969. <https://doi.org/10.1107/S0021889869006558>
- [16] COELHO, A. A. TOPAS and TOPAS-Academic: an optimization program integrating computer algebra and crystallographic objects written in C++, *J. Appl. Cryst.*, v. 51, p. 1-9, 2018. <https://doi.org/10.1107/S1600576718000183>
- [17] UNITED States Pharmacopeia National Formulary. 42. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2019.
- [18] ZHANG, Y.; HUO, M; ZHOU, J. et al. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles, **The AAPS Journal**, v. 12 (3), p. 263-271, September 2010. [https://doi: 10.1208/s12248-010-9185-1](https://doi:10.1208/s12248-010-9185-1)
- [19] COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13. p. 123–133, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)
- [20] KENNEDY, M.; HU, J.; GAO, P. Enhanced Bioavailability of a Poorly Soluble VR1 Antagonist Using an Amorphous Solid Dispersion Approach: A Case Study. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5(6), p.981–993, 2008. [doi: 10.1021/mp800061r](https://doi:10.1021/mp800061r)
- [21] WIEDMANN, T. S.; NAQWI, A. Pharmaceutical salts: Theory, use in solid dosage forms and in situ preparation in an aerosol. *Asian J Pharm Sci*, v.11, p.722–734, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2016.07.002>

- [22] ZEEBE, R. E.; WESTBROEK, P. A simple model for the CaCO₃saturation state of the ocean:The “Strangelove,” the “Neritan,” and the “Cretan” Ocean, **Geochem. Geophys. Geosyst.**, v. 4(12), p.1-26, 2003. [doi:10.1029/2003GC000538](https://doi.org/10.1029/2003GC000538)
- [23] ORR, J. C.; FABRY, V. J.; AUMONT, O. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. **Nature**, v. 29:437(7059), p.681-686, 2005. [doi: 10.1038/nature04095](https://doi.org/10.1038/nature04095)
- [24] MARKL, D.; ZEITLER, J. A. A Review of Disintegration Mechanisms and Measurement Techniques, **Pharm Res.**, v. 34(5), p. 890–917, 2017. [doi: 10.1007/s11095-017-2129-z](https://doi.org/10.1007/s11095-017-2129-z)
- [25] MEHTANI, D.; SETH, A.; SHARMA, P. et al. Cap 9: Dissolution Profile Consideration in Pharmaceutical Product Development, **Dosage Form Design Considerations**, p. 289-329, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814423-7.00009-5>
- [26] JAYA, S.; CHOWDARYP, K.P.R.; RAJESWARA RAO, P. Effect of Binders on the Dissolution Rate and Dissolution Efficiency of Ritonavir Tablets. **Int. Res J Pharm. App Sci.**, p. 109-113 2(4), 2012.
- [27] LI, J.; WO, Y. Review: Lubricants in Pharmaceutical Solid Dosage Forms. **Lubricants**, v.2, p.21-43, 2014. [doi:10.3390/lubricants2010021](https://doi.org/10.3390/lubricants2010021)
- [28] CARSTENSEN, J.T.; JARECKI, R.; ERTELL, C. Handling of non-sink conditions: in-vitro dissolution rates of some common pharmaceutical calcium salts. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 14(14), p.1971-1989, 1988. <http://dx.doi.org/10.3109/03639048809151999>

CAPÍTULO V

Composição farmacêutica sólida contendo vitamina D e sal de cálcio, método para tratar ou prevenir condições relacionadas a baixa ingestão e/ou maior necessidade de cálcio, uso da composição farmacêutica sólida e produto farmacêutico ou suplementar



Instituto Nacional da Propriedade Industrial (Brasil)

Comprovativo da submissão eletrônica

O Organismo receptor (RO/BR) acusa a recepção de um pedido internacional do PCT depositado através do ePCT-Filing. Um número de pedido e data de recepção foram atribuídos automaticamente (Instruções Administrativas, Parte 7).

Número de submissão:	050581	
Número de pedido:	PCT/BR2020/050581	
Data de recepção:	23 Dezembro 2020	
Organismo receptor:	Instituto Nacional de Propriedade Industrial (Brasil)	
A sua referência:	LTHC-0001	
Requerente:	LITHOCÁLCIO INDÚSTRIA, COMÉRCIO, IMPORTAÇÃO, EXPORTAÇÃO E REPRESENTAÇÃO LTDA.	
Número de requerentes:	2	
Título:	COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA SÓLIDA CONTENDO VITAMINA D E SAL DE CÁLCIO, MÉTODO PARA TRATAR OU PREVENIR CONDIÇÕES RELACIONADAS A BAIXA INGESTÃO E/OU MAIOR NECESSIDADE DE CÁLCIO, USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA SÓLIDA E PRODUTO FARMACÊUTICO OU SUPLEMENTAR	
Documentos submetidos:	LTHC0001-appb.xml (pctxmlib-appb.xml)	70264
	LTHC0001-decl-000001.pdf (Cessaoinventores.pdf)	612326
	LTHC0001-dpcf-000001.docx (Final - Minuta PCT - Lithocalcio - Calcio Multiparticulado_format PCT.docx)	155475
	LTHC0001-fees.xml	1734
	LTHC0001-poat-000001.pdf (ProcuraçãoUSP(convênio Lithocalcio).pdf)	449427
	LTHC0001-poat-000002.pdf (Procuração_Lithocalcio.pdf)	50604
	LTHC0001-requ.xml	8196
	LTHC0001-vlog.xml	8506
Submetido por:	Katia Jane Ferreira Evangelista (ID de cliente: user_BR_FERREIRA-EVANGELISTA_KATIA-JANE_7356)	
Carimbo de hora do comprovativo:	23 Dezembro 2020 21:45 UTC-3 (BRT)	
Sumário oficial da submissão:	0E:AB:FE:E1:87:12:E5:D4:27:88:56:A5:EA:9A:60:BC:34:0C:D9:27	

/Organismo receptor/BR/

DESCRIÇÃO

Título da Invenção:

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA SÓLIDA CONTENDO VITAMINA D E SAL DE CÁLCIO, MÉTODO PARA TRATAR OU PREVENIR CONDIÇÕES RELACIONADAS A BAIXA INGESTÃO E/OU MAIOR NECESSIDADE DE CÁLCIO, USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA SÓLIDA E PRODUTO FARMACÊUTICO OU SUPLEMENTAR

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve sobre uma composição sólida contendo um revestimento e uma matriz para administração via oral de sal de cálcio e vitamina D, método para tratar ou prevenir condições relacionadas a baixa ingestão e/ou maior necessidade de cálcio, uso da composição farmacêutica e produto farmacêutico ou suplementar. A presente invenção se situa no campo de preparações médicas contendo ingredientes ativos orgânicos e inorgânicos.

Antecedentes da Invenção

[0002] O sal de cálcio é um componente de grande interesse comercial para as indústrias farmacêuticas e de alimentos, uma vez que este é um nutriente essencial às funções do corpo humano. Deficiências na concentração de cálcio no sangue podem resultar em problemas graves relacionados à hipocalcemia.

[0003] Adicionalmente, o consumo pela via oral de composições farmacêuticas contendo sal de cálcio é uma prática comum para a reposição de cálcio de pacientes que sofrem com osteoporose, que é marcada pela perda acelerada da massa óssea.

[0004] Particularmente, o cálcio ficou largamente conhecido como um componente essencial à formação e manutenção dos ossos. E, dessa forma, as composições contendo o dito ingrediente são muito exploradas no mercado, com o intuito de auxiliar a ingestão diária de sal de cálcio e tratar condições relacionadas às baixas quantidades do mesmo no organismo.

[0005] Uma composição que ganhou muito destaque neste campo são os comprimidos contendo carbonato de cálcio que, devido a sua praticidade, são vastamente comercializados como suplementos alimentares. Porém, grande parte desses comprimidos apresentam problemas técnicos consideráveis que, de maneira não exaustiva, destacam-se: comprimidos muito grandes; desconforto gástrico gerado pela liberação do cálcio em um único comprimido; e não absorção total do sal de cálcio dos comprimidos.

[0006] Ressalta-se que a não absorção do total do cálcio é um problema técnico que deve ser evitado, uma vez que o consumidor/paciente quando compra um produto acabado contendo comprimidos de sal de cálcio, como componente ativo, espera que, na administração oral dos comprimidos, a quantidade de cálcio seja verdadeiramente absorvida pelo corpo, na quantidade tal qual diz o rótulo da embalagem do produto comprado. Inevitavelmente, este problema técnico ainda traz o prejuízo financeiro ao consumidor/paciente que opta em adquirir as composições mais caras visando uma maior quantidade de cálcio, das quais falham, pois grande parte do cálcio presente nessas composições é eliminada nas fezes, visto que o intestino é o principal eliminador de cálcio.

[0007] A absorção líquida do cálcio é definida como a diferença da absorção ingerida de cálcio e o cálcio excretado pela via fecal. E, estima-se que indivíduos normais tendem a ter uma absorção líquida de 20 a 25% da ingestão de cálcio, quando está na faixa de 300 a 2000 mg.

[0008] De todo modo, novas formas farmacêuticas contendo sal de cálcio foram desenvolvidas, com o intuito de sanar alguns desses problemas técnicos. Por exemplo, formulação sólida mastigável, cápsulas, pós e líquidos.

[0009] Com o passar do tempo, as composições farmacêuticas passaram a utilizar outros componentes visando à melhora no tratamento osteoporose e condições relacionadas deficiência da ingestão de cálcio. Entre esses componentes está a vitamina D que, entre suas funções, destaca-se a sua relação com o aumento da absorção intestinal de cálcio. Nessa finalidade destacada, a vitamina D é conhecida por poder ser utilizada em uma ampla faixa de concentração.

[0010] Dessa forma, visando melhorar a absorção do cálcio, as composições farmacêuticas passaram a conter uma fonte de cálcio e vitamina D. Contudo, essas

composições farmacêuticas continuaram apresentando problemas técnicos relacionados a grandeza dos comprimidos, sensação de mal-estar gastrointestinal, devido à grande quantidade de cálcio liberado por um único comprimido, e pelo corpo não ser capaz de absorver o conteúdo de cálcio presente nessas composições de forma eficiente.

[0011] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados diversos documentos que abrangem sobre o tema.

[0012] Por exemplo, a WO2012134590 descreve uma forma de dosagem oral sólida para administração compreendendo uma forma biologicamente utilizável de cálcio, consistindo numa mistura de carbonato de cálcio e citrato de cálcio numa proporção de 3:1, em que o carbonato de cálcio está presente em peso de 66,2% do peso total na forma de dosagem oral, e o citrato de cálcio presente numa porcentagem de peso de 21,9% do peso total da forma de dosagem oral. Em concretizações, a referida composição, detém um peso total de 1996,168 mg, compreendendo: carbonato de cálcio (1322,3 mg); citrato de cálcio 437,9 mg; hidróxido de magnésio (110,4 mg); hipromelose, (67,5 mg); croscarmelose sódio (40,6 mg); silicato de magnésio (6,5 mg); dióxido de titânio (4,3 mg); propileno glicol / dicaprilato / dicaprato (4,3 mg); estearato de magnésio (1,25 mg); inulina, oligofrutose enriquecida (1,1 mg); vitamina D₃ (0,018 mg). A WO2012134590 utiliza diversos componentes considerados essenciais a sua composição, por exemplo, hidróxido de magnésio, croscarmelose de sódio, inulina, entre outros.

[0013] Vale ressaltar que a composição descrita na WO2012134590 já está preocupada com a problemática das composições apresentarem elevado tamanho dos comprimidos, o que pode causar um desconforto para o paciente durante a deglutição, e que as composições anteriormente descritas apresentam falhas, pois o corpo não consegue absorver todo o cálcio de uma vez. Como solução ao problema a WO2012134590 provê uma composição sólida com um perfil de liberação prolongada de carbonato de cálcio, no caso, por um período de 24h, que pode melhorar na absorção.

[0014] Por outro lado, a WO2012134590 não apresenta um perfil de liberação combinado, tampouco descreve sobre minicomprimidos.

[0015] Outro documento é o US2006223730 que descreve uma composição para o tratamento de osteoporose, artrite, esporão ósseo, fascite plantar ou outros distúrbios musculoesqueléticos, a qual compreende: pelo menos 5% de cálcio proveniente de uma alga marinha, preferivelmente Rhodolith; pelo menos 5% de magnésio; e opcionalmente podendo compreender uma vitamina, preferencialmente vitamina D. Todavia, documento americano, não descreve uma composição farmacêutica contendo um perfil de liberação melhorado da vitamina D e sal de cálcio, tampouco um de comprimido reduzido.

[0016] Dessa forma, percebe-se que as composições farmacêuticas compreendendo sal de cálcio e vitamina D descritas no estado da técnica não desenvolveram um perfil bimodal e específico para a melhorada absorção do cálcio junto com a vitamina D. Conseqüentemente, o estado da técnica ainda apresenta problemas técnicos relacionados à absorção do sal de cálcio pelo corpo.

[0017] Não foram encontrados documentos que abrangem o tema de minicromprimidos em composição envolvendo sal de cálcio e vitamina D. Portanto, o estado da técnica ainda apresenta problemas relacionados à grandeza dos comprimidos, o que é nocivo à porção da população que apresenta dificuldades para deglutição e que necessitam administrar oralmente grandes comprimidos de sal de cálcio.

[0018] Dessa forma, entende-se que em vista do estado da técnica encontrado, continua-se presente problemas relacionados às composições farmacêuticas contendo sal de cálcio e vitamina D, que devem ser solucionados a fim de melhorar a absorção do cálcio no corpo, ou seja, diminuindo a quantidade de cálcio não absorvida, que é excretado pela via fecal, além da necessidade de evitar o desconforto do usuário ao administrar oralmente a dita composição, principalmente quando se trata de pacientes do grupo de idosos e crianças.

Sumário da Invenção

[0019] A presente invenção tem por objetivo resolver os problemas técnicos constantes no estado da técnica, a partir da elaboração de uma composição farmacêutica sólida na forma de comprimido contendo um revestimento externo de liberação imediata de vitamina D, e matriz com liberação prolongada de vitamina D e

sal de cálcio, que provê um novo efeito técnico para melhorada absorção do cálcio, pois possibilita a manutenção de adequadas concentrações de vitamina D no sangue durante toda a liberação do cálcio, melhorando a quantidade de cálcio absorvida pelo corpo, conseqüentemente, diminuindo a quantidade de cálcio excretado pelas fezes. Dessa forma, a presente invenção é aplicável para tratamento ou prevenção de condições relacionadas a baixa ingestão e/ou maior necessidade de cálcio no corpo como, por exemplo, a osteoporose.

[0020] Além disso, a presente invenção, preferencialmente, é apresentada na forma de minicomprimidos, por prover uma ainda mais adequada liberação de cálcio e vitamina D, que o paciente/consumidor irá consumir. Ademais, nessa forma farmacêutica, a presente invenção também resolve o problema técnico relacionado a grandeza dos comprimidos tradicionais de cálcio.

[0021] A junção do perfil de liberação distinto descrito na presente invenção em uma composição na forma de minicomprimidos desencadeia todas as vantagens técnicas da presente invenção. Uma vez, que somará a vantagem de uma liberação imediata de vitamina D e liberação prolongada do sal de cálcio e a vitamina D com a facilidade da administração da composição oral.

[0022] Dessa forma, em um primeiro aspecto, a invenção descreve sobre uma composição farmacêutica sólida contendo vitamina D e sal de cálcio, na forma de comprimido revestido consistindo de um revestimento externo com liberação imediata de vitamina D, e uma matriz com liberação prolongada de vitamina D e sal de cálcio, em que: – a matriz compreende de 10 % a 90 % em peso de cálcio e de 5 % a 50 % em peso de um ingrediente para liberação prolongada, em relação ao peso total da matriz, e de 10 U.I a 50.000 U.I de vitamina D; – o revestimento externo com liberação imediata compreende pelo de 10 U.I a 50.000 U.I de vitamina D e um polímero formador de película.

[0023] Em um segundo aspecto, a invenção refere-se a um método para tratar ou prevenir condições relacionadas a baixa ingestão e/ou maior necessidade de cálcio compreendendo a administração de pelo menos uma forma de dosagem oral da composição, conforme definido no primeiro aspecto.

[0024] Em um terceiro aspecto, a presente invenção refere-se ao uso de uma forma da composição farmacêutica, conforme definida no primeiro aspecto para preparar um

medicamento ou suplemento para tratar ou prevenir condições relacionadas a baixa ingestão e/ou maior necessidade de cálcio.

[0025] Em um quarto aspecto, a presente invenção refere-se a um produto farmacêutico ou suplemento compreendendo a composição farmacêutica sólida, conforme definida no primeiro aspecto, em que o referido produto pode ser na forma de sachê, frascos, flaconetes e caixas.

[0026] Ainda, em outro aspecto, a invenção descreve sobre o uso da composição farmacêutica sólida, conforme definido no primeiro aspecto, por ser para preparação de um medicamento ou suplemento para tratamento ou prevenção de condições relacionadas a baixa ingestão e/ou maior necessidade de cálcio, em que o dito medicamento ou suplemento armazena a composição sólida, na forma de minicomprimidos, em um recipiente farmacêuticamente adequado para armazenar uma quantidade suficiente de minicomprimidos para atingir uma quantidade terapêutica de vitamina D e sal de cálcio.

[0027] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados é a composição farmacêutica na forma de minicomprimidos contendo uma liberação imediata de vitamina D e uma liberação prolongada de vitamina D e sal de cálcio.

[0028] Entre as vantagens da presente invenção, de maneira não exaustiva destaca-se: facilidade da administração por via oral, principalmente em usuários idosos e/ou crianças; melhor distribuição do suplemento no sistema gastrointestinal; diminuição do desconforto gástrico causado pela ingestão de comprimidos contendo grandes doses de sal de cálcio; rápida liberação de vitamina D, para que a vitamina esteja em níveis adequados para a absorção do cálcio durante toda a liberação do mesmo; composição com absorção de cálcio no corpo melhorada.

[0029] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição da Figura

[0030] A Figura 1 apresenta um gráfico de perfil de dissolução de carbonato de cálcio proveniente de *Lithothamnium calcareum* realizado em equipamento de aparato III (Biodis), em meio com HCL 0,1 M. O ensaio foi realizado em triplicata e calculado a quantidade de ativo (cálcio) dissolvido em porcentagem (%).

Descrição detalhada da Invenção

[0031] A presente invenção descreve uma composição farmacêutica na forma de comprimidos compreendendo um revestimento externo contendo vitamina D para liberação imediata, e uma matriz contendo vitamina D e sal de cálcio com liberação prolongada.

[0032] Para fins da presente invenção o termo “comprimido” pode ser entendido como uma forma farmacêutica sólida composta por uma matriz, preparada através do processo de compressão, podendo apresentar um revestimento externo. O termo “comprimido”, quando descrito na presente invenção refere-se a uma forma de dosagem unitária.

[0033] Ainda, na presente invenção, o termo “minicomprimido” pode ser entendido como um subgrupo da definição do termo “comprimido”, tendo a particularidade de apresentar um diâmetro inferior a 7 mm. O termo “minicomprimido” quando descrito na presente invenção refere-se a uma forma de dosagem multiparticulada, definida por ser uma forma na qual a quantidade terapêutica do componente ativo é dividido em subunidades funcionais de liberação, sendo essas subunidades os ditos minicomprimidos.

Matriz contendo cálcio e vitamina D

[0034] A matriz utilizada na presente invenção refere-se à região interna do comprimido, ou seja, a porção interior delimitada pelo revestimento. Na presente invenção, a matriz compreende cálcio e vitamina D e um ingrediente para liberação prolongada.

[0035] A matriz compreende cerca de 10% a cerca de 90% em peso de sal de cálcio em relação ao peso total da matriz, cerca de 5 % a cerca de 50% em peso de um

ingrediente para liberação prolongada em relação ao peso total da matriz e cerca de 10 U.I a cerca de 50.000 U.I de vitamina D.

[0036] O sal de cálcio utilizado na presente invenção pode ser qualquer forma de sal biologicamente aceita para consumo. De modo ilustrativo, o sal de cálcio utilizado na presente invenção é na forma de sal de acetato, escorbato, óxido, fosfato, citrato, gluconato, carbonato, bicarbonato entre outros. A presente invenção ainda pode conter como fonte de cálcio, o cálcio provindo de fontes biológicas como, por exemplo, de algas marinhas, em que se destaca a alga *Lithothamnium calcareum*.

[0037] Preferencialmente, o sal de cálcio utilizado na presente invenção é o carbonato de cálcio. E, em uma concretização da invenção o carbonato de cálcio utilizado é proveniente da alga *Lithothamnium calcareum*, pois, além de conter diversos oligoelementos como manganês, magnésio, ferro, contém cálcio em sua forma mais solúvel.

[0038] O sal de cálcio utilizado corresponde cerca de 10% a cerca de 90% em peso em relação ao peso total da matriz. Preferencialmente, o sal de cálcio corresponde cerca de 20 % a cerca de 80 % em peso em relação ao peso total da matriz. Ainda mais preferencialmente, o sal de cálcio corresponde a cerca de 50% a cerca de 70% em peso em relação ao peso total da matriz.

[0039] A vitamina D utilizada na matriz é selecionada entre vitamina D₂, D₃ ou combinação das mesmas. Preferencialmente, a vitamina D utilizada é a vitamina D₃.

[0040] A vitamina D, está presente na matriz em uma quantidade cerca de 10 U.I a cerca de 50.000 U.I. Preferencialmente, a vitamina D, está presente na matriz em quantidade cerca de 50 U.I a cerca de 30.000 U.I. Ainda mais preferencialmente a vitamina D, está presente na matriz em uma quantidade cerca de 100 U.I a cerca de 10.000 U.I.

[0041] O ingrediente para liberação prolongada utilizado na presente invenção pertence à classe dos polímeros controladores de liberação, tendo por finalidade estender a liberação do cálcio e vitamina D contida na matriz.

[0042] Preferencialmente, o ingrediente para liberação prolongada pode ser selecionado entre derivados de celulose, metacrilatos, polissacarídeos, ftalatos,

substâncias lipofílicas e álcool polivinílico. Em uma concretização da invenção o ingrediente utilizado pode ser hidroxipropilmetilcelulose e alginato.

[0043] A matriz pode conter outros excipientes farmacêuticos, cujos objetivos são de modular aspectos físico-químicos da matriz como, por exemplo, os excipientes classificados como diluentes, aglutinantes, desintegrantes, lubrificantes e estabilizantes.

[0044] Por exemplo, a composição da presente invenção pode opcionalmente conter: diluentes/aglutinantes como a dextrose, frutose, glicose, eritritol, lactose, manitol, sorbitol, sacarose, xilitol, metilcelulose, celulose microcristalina, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, amido, amido modificado, polivinilpirrolidona, alginato de sódio, fosfato de cálcio, gelatina, polietileno glicol, entre outros; lubrificantes como o talco, ácidos esteáricos e seus sais metálicos, incluindo estearato de cálcio, estearato de magnésio, e estearato de zinco; ésteres de ácido esteárico, incluindo estearato de polioxietileno, entre outros; polissacarídeos como a goma xantana, goma gelana, inulina, goma guar, quitosano, ceratonia, e carragenina, entre outros; além de outros componentes como o dióxido de silício.

[0045] É válido destacar que para o contexto da presente invenção o termo “excipientes farmacêuticos” pode ser entendido como qualquer material inerte à composição descrita, que não serão responsáveis por desencadear um efeito terapêutico ou profilático, cujas finalidades restringem-se em auxiliar as propriedades físico-químicas do comprimido de sal de cálcio e vitamina D elaborado.

[0046] A preparação da matriz de liberação prolongada envolve a pesagem e mistura dos ingredientes, sendo que o processo pode ser feito por qualquer processo farmacêutico hábil para o fim de preparação de um comprimido ou minicomprimido, como, por exemplo, o processo de granulação úmida.

[0047] A matriz da presente invenção possibilita que o sal de cálcio e vitamina D sejam liberados de maneira prolongada, após a administração por via oral da referida composição farmacêutica.

[0048] Destaca-se que vitamina D liberada de maneira prolongada na matriz, possibilita que as concentrações da vitamina no sangue mantenham-se adequadas ao longo de toda liberação do cálcio, fator que aperfeiçoa a absorção do cálcio no corpo. Deve ser também ressaltado que quando a vitamina D da matriz começar a ser

liberada, a vitamina D presente no revestimento externo do comprimido já terá sido previamente liberada, de modo que, a vitamina D liberada pela matriz será responsável por prover a manutenção das concentrações adequadas de vitamina D no corpo durante toda a liberação do cálcio.

Revestimento externo com vitamina D

[0049] O revestimento externo do comprimido é uma mistura entre um polímero formador de película e a vitamina D. A mistura pode ser realizada por um processo que permita a suspensão da vitamina D no polímero. Tal suspensão é aplicada à superfície da matriz de liberação prolongada, utilizando qualquer equipamento que permita depositar uma película homogênea do dito polímero contendo a vitamina D na superfície dos comprimidos, como, por exemplo, uma drageadeira ou equipamento de leito fluidizado.

[0050] A suspensão a ser revestida no comprimido é uma mistura que compreende um polímero formador de película e cerca de 10 U.I a cerca de 50.000 U.I de uma vitamina D.

[0051] O revestimento pode conter outros ingredientes que buscam por atribuir vantagens adicionais à composição como, por exemplo, a vitamina E, por ter a função de antioxidante. Entretanto, é essencial a invenção o revestimento compreender uma suspensão de um polímero e a vitamina D.

[0052] Além disso, outros excipientes farmacêuticos como aditivos de revestimento podem ser usados em conjunto ao polímero formador de película como, por exemplo, opacificantes, corantes e flavorizantes.

[0053] Em uma concretização, o revestimento contém cerca de 1 a cerca de 40% em peso do polímero formador de película, acompanhado de outros excipientes farmacêuticos aditivos de revestimento como, por exemplo, talco, dióxido de titânio, pigmento e a água, e cerca de 10 U.I a cerca de 50.000 U.I de vitamina D.

[0054] O polímero formador de película utilizado na presente invenção permite a imediata liberação da vitamina D, isso se deve ao fato do polímero ser facilmente solúvel nas condições do trato gastrointestinal. Particularmente, o polímero formador de película utilizado pertence à classe dos derivados de celulose, metacrilatos,

polissacarídeos, ftalatos e álcool polivinílico. Preferencialmente, o polímero utilizado é um polímero selecionado entre derivados de celulose, metacrilatos e álcool polivinílico, goma guar, ou combinação dos mesmos. Em outra concretização o polímero é hidroxipropilmetilcelulose ou álcool polivinílico.

[0055] A vitamina D suspendida no polímero é selecionada entre vitamina D₂ e D₃, ou combinação das mesmas. Preferencialmente, é utilizada a vitamina D₃.

[0056] A vitamina D, está presente no revestimento externo em cerca de 10 U.I a cerca de 50.000 U.I. Preferencialmente a vitamina D está presente no revestimento externo em cerca de 50 U.I a cerca de 30.000 U.I. Ainda mais preferencialmente a vitamina D está presente no revestimento externo em cerca de 100 U.I a cerca de 10.000 U.I.

[0057] A suspensão de vitamina D e polímero de liberação imediata tem como função prover um revestimento de liberação imediata de vitamina D na superfície da matriz da composição farmacêutica sólida, na forma de comprimido ou minicomprimido. Destaca-se que o dito revestimento apresenta um efeito técnico surpreendente quando combinado com a matriz, que é possibilitar a otimização da absorção e aproveitamento do cálcio no corpo, pois a liberação imediata da vitamina D permite que à medida que o cálcio for sendo liberado pela matriz, a vitamina D já esteja em concentrações adequadas para otimizar a absorção do cálcio desde o seu início, e que a vitamina D seja mantida em concentrações adequadas devido sua liberação de maneira prolongada pela matriz.

Composição farmacêutica sólida.

[0058] Dessa forma, a presente invenção descreve sobre uma composição farmacêutica sólida que tem por função aumentar a absorção de cálcio no intestino, uma vez que apresenta uma formulação de cálcio e vitamina D de liberação sincronizada com a fisiologia da absorção de cálcio em humanos.

[0059] A composição da presente invenção apresenta-se na forma de comprimido, preferencialmente na forma de minicomprimidos, compreendendo uma matriz com liberação prolongada de vitamina D e sal de cálcio e um revestimento externo com liberação imediata de vitamina D. A composição, destaca-se por possuir dois distintos mecanismos de liberação da vitamina D: um primeiro de liberação imediata, provido

pelo revestimento externo; e um segundo de liberação prolongada, provido pela matriz de liberação prolongada. Essa combinação de perfis possibilita por um pico imediato de liberação de vitamina D, com objetivo de se obter concentrações adequadas para absorção do cálcio, seguido pela liberação controlada da vitamina D, com objetivo de manter a dita concentração adequada para absorção do cálcio ao longo do tempo. Ademais, a matriz da composição permite a liberação prolongada do cálcio, de tal forma que a composição apresente o perfil de liberação do cálcio, que é destacado pela curva crescente de liberação do cálcio ao longo do tempo, conforme exemplificado na Figura 5.1.

[0060] Na composição, os perfis de liberação da vitamina D e o perfil de liberação do sal de cálcio, são sinérgicos frente à absorção do cálcio, pois possibilitam que o cálcio seja muito mais eficientemente absorvido durante toda a sua liberação, o que diminui a quantidade de cálcio não absorvida, que seria eliminado pelas fezes.

[0061] A composição é apresentada na forma de comprimidos. Preferencialmente, a composição é apresentada na forma de minicomprimidos, que apresentam um diâmetro de cerca de 0,5 mm a cerca de 7 mm.

[0062] Adicionalmente, o conjunto de dois ou mais minicomprimidos, pode ser denominado como “multiparticulado” e podem ser entendido como uma forma de dosagem na qual as quantidades terapêuticas dos componentes ativos, no caso, preferencialmente, sal de cálcio e vitamina D, são divididas em vários minicomprimidos.

[0063] A composição quando apresentada na forma de minicomprimidos, apresenta uma facilitada administração pela via oral, pois o tamanho reduzido dos minicomprimidos facilita, sobremaneira, a sua deglutição, apresentando-se como uma alternativa mais confortável para ingestão do cálcio em doses terapêuticamente aceitáveis.

[0064] Ainda, os minicomprimidos quando administrados apresentam melhorada distribuição no sistema gastrointestinal, pois, as subdivisões das doses de cálcio terapêuticamente aceitavam em pequenas subunidades, que são exatamente os minicomprimidos, promove um melhor espalhamento da dita dose pelo sistema gastrointestinal. Ademais, a sua liberação prolongada, promovida pela matriz, permite que a quantidade de cálcio não seja liberado abruptamente.

[0065] De modo similar ao mecanismo que promove melhor distribuição da presente composição farmacêutica no sistema gastrointestinal, a divisão das doses em subunidades e a lenta liberação promovida pela matriz, impedem uma liberação imediata da dose total, o que se apresenta mais confortável para o paciente, reduzindo a sensação de peso no estômago, característico da ingestão de grandes quantidades de cálcio.

[0066] Assim, todos os fatores implementados na presente invenção, permitem que a absorção de cálcio pelo organismo seja otimizada, melhorando seu aproveitamento.

[0067] A presente invenção, portanto, também se refere a um método para tratar ou prevenir condições relacionadas a baixa ingestão e/ou maior necessidade de cálcio, compreendendo a administração de pelo menos uma forma de dosagem oral da referida composição de cálcio e vitamina D.

[0068] O método para tratar ou prevenir pode envolver administrar mais de uma forma de dosagem, isto é, administração de mais de um dos minicomprimidos da presente invenção. No caso, a quantidade de minicomprimido a serem utilizados dependerá da quantidade de cálcio e vitamina D desejada que o paciente/consumidor consumo. Esse tipo de dosagem refere-se a uma forma de dosagem multiparticulada.

[0069] Todavia, o método pode envolver apenas a administração de uma única forma de dosagem, isto é, um comprimido ou minicomprimido, quando este já está em quantidade de cálcio e vitamina D satisfatória para atender ao efeito terapêutico desejável.

[0070] A composição da presente invenção pode ser utilizada para a preparação de um medicamento ou suplementos para tratamento ou prevenção de condições relacionadas a baixas concentrações de cálcio nos ossos e no sangue. Para este fim, o suplemento ou medicamento deve ser capaz de armazenar a composição sólida na forma preferencial de minicomprimidos em um recipiente como, por exemplo, sachês, frascos, flaconetes e caixas. Preferencialmente, os recipientes são sachês, devido as suas praticidades.

[0071] Adicionalmente, é essencial que o recipiente deva conter uma quantidade de suficiente de minicomprimidos para atingir a quantidade terapêutica de vitamina D e sal de cálcio.

[0072] Portanto, a presente invenção também pode ser usada como um método para tratar ou prevenir condições relacionadas a baixa ingestão de cálcio e/ou maior necessidade de cálcio, como, por exemplo, a osteoporose.

Exemplos - Concretizações

[0073] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Desenvolvimento da matriz contendo *Lithothamnium calcareum* (250 mg) e vitamina D₃ (400 UI) com liberação prolongada

Método

Granulação por via úmida

[0074] A granulação foi realizada aplicando os excipientes: 10% de celulose microcristalina (PH101) e 10 % de goma gelana LA, conforme a Tabela 5.1. Para preparação dos grânulos os excipientes foram tamisados em tamis de abertura 500 mm e, em seguida, misturados em um saco plástico e levado a um misturador planetário, adicionando água purificada na proporção de 0,625 mL/g (250 mL). A amostra foi homogeneizada, sendo em seguida passada em tamis 3,35 mm. Os grânulos obtidos foram secos em estufa a 50°C por 10h. Após a secagem calibrou-se o granulado seco em tamis malha 790 µm. A umidade inicial e final foram determinadas em Analisador de Umidade por Infra-vermelho – IV2002 (Gehaka).

[Tabela 5.1] – Composição do granulado para o desenvolvimento das formulações de minicomprimidos de liberação prolongada.

Material	Quantidade (g)
<i>Lithothamnium calcareum</i>	320
Celulose microcristalina (PH101)	40
Goma gelana LA	40
Água purificada	250 mL

Desenvolvimento das composições de minicomprimidos

[0075] Foi empregado um delineamento experimental contendo dois fatores em dois níveis (2^2) conforme Tabelas 5.2 e 5.3, de modo a avaliar quantitativamente os agentes formadores de matriz, o hidroxipropilmetilcelulose e o alginato nas formulações. Foram fixadas a dose de dióxido de silício coloidal (1%) e estearato de magnésio (1%).

[Tabela 5.2] – Variáveis e os respectivos níveis empregados no delineamento experimental 2^2 para a produção dos minicomprimidos de liberação prolongada.

Variáveis	Níveis	
	-1	+1
Hidroxipropilmetilcelulose	10	20
Alginato	5	10

[Tabela 5.3] – Matriz de ensaio com fatorial fracionado de 2², resultando em formulações, nas quais foram distribuídas aleatoriamente pelo software Statística 13.0 (Dell Inc., Tulsa, USA, 2015).

Formulação	Hidroxipropilmetilcelulose	Alginato
1	10	-
2	20	-
3	-	5
4	-	10

[0076] Para cada formulação foram pesados os excipientes, passados em tamis de abertura 500 µm e em seguida adicionado os grânulos de *Lithothamnium calcareum* calibrados em tamis de abertura 710 µm, homogeneizados em saco plástico e levados à máquina de comprimir excêntrica FABBE (Brasil) com punção múltiplo de 3 mm.

[0077] A Tabela 5.4 descreve a quantidade de granulado utilizado a partir do preparo descrito em relatório anterior para compor cada formulação, e também os componentes das formulações de minicomprimidos de liberação prolongada.

[Tabela 5.4] – Componentes das formulações (%) de minicomprimidos de liberação prolongada contendo 250 mg de Ca⁺⁺ e 400 UI de vitamina D₃, sendo 200 UI no núcleo da formulação e 200 UI no revestimento.

Composição	F1	F2	F3	F4
Granulado	77,96	77,96	77,96	77,96
Hidroxipropilmetilcelulose	10	20	-	-
Alginato	-	-	5	10
Estearato de magnésio	1	1	1	1
Dióxido de silício coloidal	1	1	1	1
Celulose microcristalina PH102	10	-	15	15
Vitamina D ₃	0,037	0,037	0,037	0,037

Caracterização da matriz contendo *Lithothamnium calcareum* (250 mg) e vitamina D₃ (400 UI) com liberação prolongada

Peso médio, dureza, espessura e diâmetro

[0078] Os ensaios foram realizados conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira, 5ª ed. (2010). O peso médio foi adquirido pesando 20 unidades de cada formulação, (pesagem individual) em balança analítica Shimadzu AUW 220D® (Shimadzu Corporation, Kyoto - Japan). Para a dureza foram separados 10 minicomprimidos, utilizando Durômetro 298-ATTS (Ethik Technology, São Paulo, Brasil), calculando-se a média do peso dos multiparticulados e o desvio padrão.

[0079] A espessura e diâmetro dos minicomprimidos foram determinadas pela média dos resultados apresentados por 10 minicomprimidos com o auxílio de um paquímetro, calculando-se a média e o desvio padrão.

Friabilidade

[0080] A friabilidade foi avaliada a partir da pesagem de 10 gramas de minicomprimidos isentos de pó, juntamente com 200 esferas de vidro de 4,3 mm de diâmetro, empregando-se friabilômetro FAB-2 (Logan Instruments, New Jersey - EUA). O tempo do ensaio foi de 8 minutos, totalizando 200 rotações. O resultado foi expresso em porcentagem de perda de massa.

Desintegração

[0081] O ensaio de desintegração foi realizado conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010), utilizando o equipamento desintegrador 301 (Ethik Technology, São Paulo - Brasil). Para os ensaios foram utilizados seis minicomprimidos para cada formulação. O meio utilizado foi água (750 mL) à 37 °C.

Doseamento do teor de cálcio das formulações

[0082] O teor de cálcio das formulações foi obtido por intermédio do método descrito nas Farmacopeia Brasileira, 5ª ed. (2010) e Farmacopeia Americana (USP39) com algumas adaptações. O procedimento foi realizado em triplicata para cada formulação.

Foram pesados e triturados cerca de 2 gramas de minicomprimidos de cada formulação, dessecadas em estufa à 90 °C por 2 horas. Pesou-se 400 mg de cada amostra dessecada.

[0083] Após o preparo dos reagentes, num béquer adicionou HCl 1M juntamente com a amostra aquecida a 85 °C por 30 minutos. Logo, completou-se o volume com água, e, após resfriar, filtrou-se em filtro quantitativo. Em seguida, uma alíquota de 20 mL do filtrado foi transferida para um erlenmeyer e incorporou-se 30 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1M e uma pequena quantidade de indicador azul de hidroxinaftol. A solução foi agitada por um agitador magnético (Heidolph - Germany) e a titulação foi realizada por intermédio de uma bureta digital (Bürette II, Germany) adicionando-se EDTA até o ponto de viragem para azul.

Resultados da caracterização da matriz contendo *Lithothamnium calcareum* (250 mg) e vitamina D₃ (400 UI) com liberação prolongada

[0084] Os resultados das 4 formulações de minicomprimidos de liberação prolongada estão indicados na Tabela 5.5.

[Tabela 5.5] – Caracterização das formulações de minicomprimidos com as respectivas médias e \pm desvio padrão.

Formulações	Peso médio (mg)	Dureza (kgf)	Espessura (mm)	Diâmetro (mm)
1	24,37 \pm 0,90	0,7 \pm 0,50	0,2 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0
2	25,28 \pm 0,70	1,17 \pm 0,20	0,2 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0
3	24,98 \pm 0,93	1,03 \pm 0,41	0,2 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0
4	24,88 \pm 0,79	0,6 \pm 0,3	0,2 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0

Friabilidade

[0085] Os resultados de friabilidade dos minicomprimidos encontram-se na Tabela 5.6.

[Tabela 5.6] - Friabilidade das formulações.

Formulações	Peso (g) antes	Peso (g) depois	% perda
1	10	9,21522	7,84
2	10	9,91642	0,84
3	10	9,42311	5,76
4	10	9,60142	3,98

[0086] De acordo com os resultados, apenas a formulação 2 apresenta friabilidade aceitável, ou seja, < 1,5 %.

Desintegração

[0087] O tempo médio de desintegração das formulações de minicomprimidos de liberação prolongada está descrito na Tabela 5.7.

[Tabela 5.7] – Desintegração (s) dos minicomprimidos e \pm desvio padrão.

Formulações	Média (minutos) \pm DP
1	2'04" \pm 0,83'
2	34'60" \pm 4'93"
3	3'88" \pm 2'45"
4	6'86" \pm 3'03"

[0088] O tempo de desintegração das formulações 1, 3 e 4 não foram suficientes para considerá-los de liberação prolongada.

Doseamento do teor de cálcio das formulações

[0089] O doseamento do cálcio das formulações de minicomprimidos está expresso na Tabela 5.8.

[Tabela 5.8] – Doseamento de cálcio (Ca⁺⁺) das formulações de minicomprimidos.

Formulações	Teor de Ca ⁺⁺ (mg) (42 minicomprimidos)	% Ca ⁺⁺	Teor de Ca ⁺⁺ (mg) por unidade
1	252,20	99,0	5,98
2	252,70	100,2	6,30
3	250,58	99,20	6,25
4	250,98	99,74	6,35

[0090] Assim, a formulação 2 apresenta os melhores resultados em todos os ensaios executados.

Desenvolvimento do revestimento externo

[0091] Inicialmente, deve-se pesar os ingredientes utilizados, como: talco, dióxido de titânio, goma guar, hipromelose, vitamina D₃, álcool polivinil, maltodextrina, pigmento e água purificada. Após a pesagem, deve ser feita a mistura, em um recipiente e um agitador em hélice.

Aplicação do revestimento na matriz de liberação prolongada

[0092] O revestimento dos minicomprimidos é realizado em equipamento de leito fluidizado HÜttlin®, modelo Mycrolab® (Steinen, Germany), aplicando-se uma suspensão anteriormente produzida e 200 UI de vitamina D₃.

[0093] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

[Reivindicação 1] Composição farmacêutica sólida contendo vitamina D e sal de cálcio caracterizada por compreender uma matriz com liberação prolongada de vitamina D e sal de cálcio e um revestimento externo com liberação imediata de vitamina D, em que:

– a matriz compreende de 10 % a 90 % em peso de cálcio e de 5 % a 50 % em peso de um ingrediente para liberação prolongada, em relação ao peso total da matriz, e de 10 U.I a 50.000 U.I de vitamina D;

– o revestimento externo com liberação imediata compreende pelo de 10 U.I a 50.000 U.I de vitamina D e um polímero formador de película.

[Reivindicação 2] Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo comprimido ser um comprimido revestido ou minicomprimido revestido tendo um diâmetro de 0,5 a 7mm.

[Reivindicação 3] Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 2, caracterizada pelo revestimento externo ser uma suspensão de vitamina D e o polímero para a liberação imediata.

[Reivindicação 4] Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizada pelo revestimento externo compreender de 1 a 40% em peso do polímero formador de película acompanhado de excipientes farmacêuticos aditivos de revestimento e de 1 a 10 U.I a 50.000 U.I de vitamina D.

[Reivindicação 5] Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizada pelo revestimento compreender de 1 a 40% em peso do polímero formador de película, acompanhado de talco, dióxido de titânio, pigmentos e água, e de 10 U.I a 50.000 U.I de vitamina D.

[Reivindicação 6] Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizada pelo polímero formador de película ser selecionado do grupo dos derivados de celulose, metacrilatos, polissacarídeos, ftalatos e álcool polivinílico ou combinação dos mesmos.

[Reivindicação 7] Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizada pelo polímero formador de película ser selecionado entre

derivados de celulose, metacrilatos e álcool polivinílico, goma guar, ou combinação dos mesmos.

[Reivindicação 8] Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizada pelo polímero formador de película ser hidroxipropilmetilcelulose ou álcool polivinílico.

[Reivindicação 9] Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizada pelo ingrediente para liberação prolongada ser selecionado entre derivados de celulose, metacrilatos, polissacarídeos, ftalatos, substâncias lipofílicas, álcool polivinílico ou combinação dos mesmos.

[Reivindicação 10] Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, caracterizada pelo ingrediente para liberação prolongada ser selecionado entre hidroxipropilmetilcelulose, alginato ou combinação dos mesmos.

[Reivindicação 11] Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, caracterizada pela vitamina D ser vitamina D₂ ou D₃, ou combinação dos mesmos.

[Reivindicação 12] Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, caracterizada pela vitamina D ser a vitamina D₃.

[Reivindicação 13] Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, caracterizada pelo sal de cálcio ser selecionado entre na forma de sal de acetato, escorbato, óxido, fosfato, citrato, gluconato, carbonato e bicarbonato.

[Reivindicação 14] Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, caracterizada pelo sal de cálcio ser carbonato de cálcio.

[Reivindicação 15] Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 14, caracterizada pelo sal de cálcio ser carbonato de cálcio obtido de *Lithothamnium calcareum*.

[Reivindicação 16] Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15, caracterizada pelo cálcio estar presente na matriz em uma quantidade de 50 a 70% em peso em relação ao peso total da matriz e pela vitamina D₃ estar presente na matriz em uma quantidade de 100 a 10.000 U.I.

[Reivindicação 17] Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 16, caracterizada pela vitamina D₃ estar presente no revestimento externo em uma quantidade de 100 a 10.000 U.I.

[Reivindicação 18] Método para tratar ou prevenir condições relacionadas a baixa ingestão de cálcio e/ou maior necessidade de cálcio caracterizado por compreender a administração da composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 17.

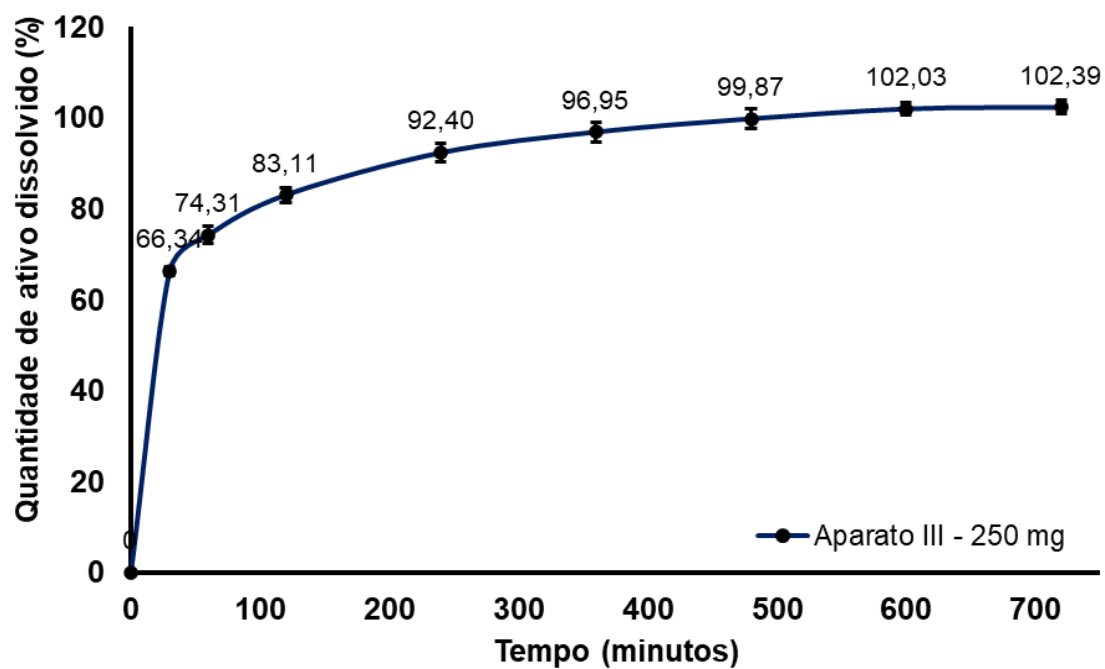
[Reivindicação 19] Uso da composição farmacêutica sólida, conforme definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 17, caracterizado por ser para preparação de um medicamento ou suplemento para tratamento ou prevenção de condições relacionadas a baixa ingestão e/ou maior necessidade de cálcio.

[Reivindicação 20] Produto farmacêutico ou suplementar caracterizado por compreender a composição farmacêutica sólida, conforme definida nas reivindicações de 1 a 17, em que o referido produto pode ser na forma de sachê, frascos, flaconetes e caixas.

Resumo

A presente invenção tem por objetivo descrever sobre uma composição farmacêutica sólida contendo um revestimento externo de liberação imediata de vitamina D, e matriz com liberação prolongada de vitamina D e sal de cálcio, que permite um efeito técnico para melhorada absorção do cálcio, pois possibilita adequadas concentrações de vitamina D no sangue durante toda a liberação do cálcio, o que diminui a quantidade de cálcio excreto pelas fezes e possibilita melhorar a eficácia no tratamento de osteoporose e outras doenças relacionadas a deficiência na concentração cálcio no sangue. A composição da presente invenção pode ainda ser apresentada na forma de minicomprimidos, para promover uma facilitada administração pela via oral, como também permitir modular a quantidade de cálcio e vitamina D que o paciente/consumidor irá consumir. A presente invenção descreve sobre uma composição farmacêutica sólida, método para tratar ou prevenir condições relacionadas a baixa ingestão e/ou maior necessidade de cálcio, uso da composição farmacêutica e produto farmacêutico ou suplementar. A presente invenção se situa no campo de preparações médicas contendo ingredientes ativos orgânicos e inorgânicos.

[Figura 5.1] - Perfil de liberação do cálcio destacado pela curva crescente de liberação do ativo ao longo do tempo.



REFERÊNCIAS¹

ADUSUMILLI, P. S.; MANDEL, K. G.; MIRCHANDANI, H. L. Method and composition for increasing calcium uptake. Depositante: SmithKline Beecham Corp. US20020009474. Depósito: 6 abr. 1999 Concessão: 24 jan. 2002.

DURKEE, S. E.; BEKE, P.; FIRST, E. R. et al., Calcium Supplement. Depositante: BAYER HEALTHCARE LLC. WO 2012134590. Depósito: 23 mar. 2012 Concessão: 4 out. 2012;

FARMACOPEIA Brasileira, 5^a ed, Brasília, 2010.

FERNÁNDEZ, A. A.; Lousame, D. B.; GUERRERO, C. G. Orally-dispersible pharmaceutical compositions. Depositante: ITF RESEARCH PHARMA, S.L.U. EP1837019. Depósito: 24 out. 2005 Concessão: 26 set. 2007.

HOLICK, M. F., Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease, **Am J Clin Nutr.**, v. 80(suppl), p.1678S– 1688S, 2004. [DOI: 10.1093/ajcn/80.6.1678S](https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1678S)

KRISHNAMURTHY, T. N. Controlled release matrix for pharmaceutical. Depositante: Euro Celtique SA. US5811126. Depósito: 2 out. 1995 Concessão: 22 set. 1998.

MEIGNANT, C; STENGER, E. Therapeutic combination of vitamin and calcium in unitary galenic tablet form, a method of obtaining it, and the use thereof. Depositante: Laboratoires Innothera SAS. US6716454B12. Depósito: 10 jun. 2002 Concessão: abr. 6, 2004

MILLER, R. B.; LESLIE, S. T.; MALKOWSKA, S. T. A. et al. Sustained release compositions and a method of preparing pharmaceutical compositions. Depositante: Euro Celtique SA. US5965163. Depósito: 30 set. 1997 Concessão: 12 out. 1999.

NEULS, D.; NEVES, M., Calcium Supplements. Depositante: HL Distribution Co. US 2006/0223730. Depósito: 08 dez. 2005 Concessão: 05 out. 2006.

PARADISSIS, G; LEVINSON, R. S.; HEETER, G. et al. Multi-vitamin and mineral supplement for pregnant women. Depositante: KV Pharmaceutical Corporation. WO94/06415. Depósito: 21 set. 1993 Concessão: 31 mar. 1994.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

PATEL, Ajit Ramanial. A composition for enhancing the strength of bones. Depositante: Ajit Ramanial Patel. GB2507473. Depósito: 13 set. 2012. Concessão: 07 mai. 2014

PETERS, D.; DENICK, JR. J., Chewable mineral supplement. Depositante: Warner-Lambert Company, Morris Plains, N.J. US45822709A. Depósito: 8 fev. 1985 Concessão: 15 abr. 1986.

PILLAY, V.; FASSIHI, R. Monolithic tablet for controlled drug release. Depositante: Temple University, Philadelphia, Pa. US6090411. Depósito: 9 mar. 1998 Concessão: 18 jul. 2000.

SÁNCHEZ, A.; PUCHE, R.; ZENI, S. et al., Papel del calcio y de la vitamina D en la salud ósea (Parte II), **Reemo**, v.12(1), p.14-29, 2003.

SIRAJ, S.; KHAN, G. J.; HUZAIFA, P. Et al., Mini tablet: A recent approach of drug delivery, **IJIPSR**, v. 3(11), p. 1609-1625, 2015.

STOLTENBERG, I.; BREITKREUTZ, J., Orally disintegrating mini-tablets (ODMTs)--a novel solid oral dosage form for paediatric use, **Eur J Pharm Biopharm**, v. 78(3), p.462-469, 2011. [DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.02.005](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.02.005)

TOSETTI, A.; VITI, G. Effervescent pharmaceutical compositions containing vitamin D, calcium and phosphate and their therapeutic use. Depositante: Menarini International Operations Luxembourg S.A. EP1651191NWB1. Depósito: 17 jul. 2003. Concessão: 03.05.2006

UNITED States Pharmacopeia National Formulary. 39. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2016.

VENTOURAS, Kimon. Controlled release tablet. Depositante: Zyma SA, Nyon, Switzerland. US4784858. Depósito: 22 ago. 1986. Concessão: 15 nov. 1988.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)