

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA**

**STELA RAMIREZ DE OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO E FARMACOTÉCNICO DE  
FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS DE ISOFLAVONA DE  
SOJA**

GOIÂNIA  
2010

**STELA RAMIREZ DE OLIVEIRA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO E FARMACOTÉCNICO DE  
FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS DE ISOFLAVONA DE  
SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas  
Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Martins Lima

GOIÂNIA  
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
GPT/BC/UFG**

Oliveira, Stela Ramirez.  
O482d Desenvolvimento analítico e farmacotécnico de formas  
farmacêuticas sólidas de isoflavona de soja [manuscrito] /  
Stela Ramirez de Oliveira. - 2010.  
95 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eliana Martins Lima.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,  
Faculdade de Farmácia, 2010.

Bibliografia.

Inclui lista de tabelas, figuras, abreviaturas e siglas.

1. Tecnologia Farmacêutica 2. Fitoterápico 3.  
Comprimidos 4. Controle de Qualidade 5. Isoflavona  
I. Título.

CDU: 615.012

## Folha de Aprovação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacéuticas da Universidade Federal de Goiás, em 05 de março de 2010, pela mestranda Stela Ramirez de Oliveira.

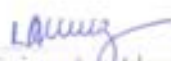
Banca Examinadora:



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Eliana Martins Lima (FF/UFG)  
Presidente



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara (FF/UFG)



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Danielle Guimarães Almeida Diniz (FF/UFG)

Ao Sr Urbano Gregório Perdomo Naranjo  
pela maravilhosa pessoa que é  
e por tudo que me ensinou.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família, que sempre esteve ao meu lado me apoiando.

Ao Allys Vilela de Oliveira, por todo carinho, auxílio e compreensão.

A professora Dra Eliana, por acreditar no meu potencial, pela oportunidade e orientação.

A professora Dra Danielle Diniz, por todos os conselhos, ajuda, apoio e dedicação.

Ao professor Dr Ricardo Neves Marreto, pela ajuda e sugestões.

A Fernanda Bellato, pela atenção, conselhos, por me defender e salvar tantas vezes.

Ao Marco Júnio Peres Filho, pelo companheirismo, por toda ajuda ao longo deste trabalho, pelas alegrias e sorrisos proporcionados.

A Mariana de Oliveira Berretta, pelos grandes ensinamentos, ajuda, contribuição, atenção e principalmente pela amizade.

A Stephania pelas contribuições e ensinamentos.

A Emmanuele e a Flávia Neri, pelos ensinamentos de estatística.

A Erika Crispim, pelo companheirismo e paciência.

Aos meus companheiros de laboratório Fernanda Steger, César, Marilisa Gaeti, Thais Leite, Luciano, Leonardo, Ana Lúcia, Fabrícia, Lívia, Luciana, por todas as contribuições e pelo convívio.

A TKS Farmacêutica e todos os meus colegas que contribuíram para este projeto se tornar realidade.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse sonho.

## RESUMO

Isoflavonas são flavonóides encontrados em abundância nos grãos de soja (*Glycine max* L.). Essas substâncias têm estrutura semelhante ao estrógeno e possuem uma ação fracamente estrogênica. São utilizadas no tratamento dos sintomas da menopausa como alternativa às terapias de reposição hormonal convencionais, por provocarem menor número de efeitos colaterais. As isoflavonas de soja estão entre as matérias-primas vegetais com ações de interesse para obtenção de formas farmacêuticas sólidas. A alta variabilidade de teores de isoflavonas em cápsulas e comprimidos disponíveis comercialmente demonstra a necessidade de desenvolvimento farmacotécnico e controle de qualidade adequados para este fitoterápico. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento analítico e farmacotécnico de formas farmacêuticas sólidas de isoflavona de soja, utilizando como matéria-prima extrato seco de soja padronizado. Para verificar a qualidade do extrato foi realizada análise microbiológica e análise do teor dos marcadores. Os resultados obtidos através do ensaio microbiológico não demonstrou contaminação microbiológica do extrato, não tendo crescimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Para avaliação do teor e da porcentagem dissolvida de ambos os marcadores foram desenvolvidas e validadas tanto metodologia analítica de quantificação de daidzeína e genisteína por cromatografia líquida de alta eficiência quanto metodologia para avaliar o perfil de dissolução dos comprimidos obtidos. Para análise cromatográfica dos marcadores foi utilizado método isocrático, com fase móvel constituída por metanol com 0,1% de ácido acético, água com 0,1% de ácido acético e acetonitrila na proporção 64:32:4, fluxo de 0,7 mL/min e temperatura de 30°C. Nesta condição os picos foram simétricos, tiveram resolução maior que 2, com tempos de retenção de 3,13 e 3,72 da daidzeína e genisteína, respectivamente. A avaliação do teor dos marcadores daidzeína e genisteína, demonstrou que as concentrações no extrato foram 27,8% e 11,1%, respectivamente. Em relação ao estudo de pré-formulação foi feita análise térmica e a avaliação das propriedades dos pós e grânulos. Foram desenvolvidas seis formulações de comprimidos de isoflavona, sendo uma por compressão direta e cinco por granulação úmida. Nos resultados da análise térmica não foram observadas possíveis interações dos excipientes com o extrato. O melhor método de obtenção dos comprimidos foi por granulação úmida, pois apresentou melhores propriedades compressionais com velocidade de escoamento variando entre 4,5 e 6,7 s/100g e compressibilidade entre 16,85% e 26,06%. A formulação por granulação úmida 3 foi a que apresentou melhor desempenho segundo os parâmetros analisados, apresentando teor de 92,66% e 92,76% de daidzeína e genisteína, respectivamente, desintegração de 15 minutos, e seu fluxo foi caracterizado como excelente. No desenvolvimento do método analítico para dissolução dos comprimidos de isoflavona foi feito o teste de solubilidade para definir o melhor meio, sendo o meio água com 3% de lauril sulfato de sódio o que dissolveu maior quantidade de daidzeína e genisteína na temperatura de 37°C em comparação com os outros meios. Os demais parâmetros definidos através do desenvolvimento do método foram aparato pá, velocidade de rotação de 100 rpm e 900 mL de volume de meio. Os resultados mostraram a possibilidade de obtenção de formas farmacêuticas sólidas promissoras para veiculação de isoflavona, além de metodologias otimizadas para controle de qualidade para análise da matéria-prima e do produto acabado.

**Palavras-chave:** Pré-formulação, comprimidos, dissolução, fitoterápico, isoflavona, daidzeína, genisteína.

## ABSTRACT

Isoflavones are flavonoids found in abundance in grains of soy (*Glycine max* L.) and its derivatives. These substances have estrogen like structure and weakly estrogenic action. They are used for treatment of menopause symptoms as an alternative to conventional hormone replacement therapies, because they cause fewer side effects. Soy isoflavones are amongst herbal products of great interest to obtain solid dosage forms. High assay variability of isoflavones in commercially available capsules and tablets shows the need of appropriate drug development and quality control for this herbal product. The aim of this work was drug development and quality control of soy isoflavone solid dosage forms, using standardized dry extract of soy. To evaluate the quality of the extract microbiologic and assay analysis of this drug's markers were performed. Results obtained from microbiological test did not show microbiologic contamination of the extract, as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* did not grow. To evaluate assay and dissolution percentage of both markers analytical methodology for quantification of daidzein and genistein by high performance liquid chromatography was developed, and also a method to analyze dissolution profile of the obtained tablets. Isocratic method was used for chromatographic analysis of the markers, with mobile phase of methanol with 0.1% of acetic acid, water with 0.1% of acetic acid and acetonitrile in proportion 64:32:4, flow of 0.7 mL/min and temperature of 30°C. At this condition, peaks were symmetric, had resolution lower than 2, with retention times of 3,13 and 3,72 for daidzein and genistein, respectively. Assay evaluation of the markers daidzein and genistein showed that concentrations in the extract were 27,8% and 11,1%, respectively. To accomplish preformulation study, thermal analysis and powder and granules flow evaluation were made. Six formulations of isoflavone tablets were developed, one by direct compression and five by wet granulation. Results of thermal analysis showed no possible extract interactions between tested excipients and extract. Wet granulation was the best method to obtain tablets, because it presented the best compressional properties with flow velocity between 4,5 and 6,7 s/100g and compressibility between 16,85% and 26,06%. GU3 formulation, which presented the best performance according to evaluated parameters, made by wet granulation, showed 92,66% and 92,76% of daidzein and genistein, respectively, disintegration of 15 minutes, and its flow was categorized as excellent. In analytical dissolution method development of isoflavone tablets solubility test was performed to define the best medium, and water with 3% of sodium lauryl sulfate dissolved the greatest amount of daidzein and genistein at tested temperature, 37°C, in comparison with the other medium. Other parameters defined through method development were paddle apparatus, stirring speed of 100 rpm and 900 mL of medium volume. Results showed the possibility to obtain promising solid dosage forms to deliver isoflavone, and optimized quality control methodologies to analyze raw material and finished product.

**Key words:** Preformulation, tablets, dissolution, herbal product, isoflavone, daidzein, genistein.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condições cromatográficas utilizadas para o desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência.	17
Tabela 2	Componentes das formulações GU1 a GU5 e CD1.	24
Tabela 3	Meios utilizados no ensaio de solubilidade.	27
Tabela 4	Fatores do método de dissolução.	28
Tabela 5	Planejamento fatorial fracionário $2^{4-1}$ .	28
Tabela 6	Condições avaliadas no planejamento fatorial	28
Tabela 7	Resultados da contagem de bactérias, fungos e leveduras.	30
Tabela 8	Precisão e Exatidão obtidas para a daidzeína obtidas utilizando método cromatográfico descrito no item 5.2.	36
Tabela 9	Precisão Intermediária e Exatidão obtidas para a daidzeína utilizando método cromatográfico descrito no item 5.2.	36
Tabela 10	Precisão e exatidão obtidas para a genisteína utilizando método cromatográfico descrito no item 5.2.	37
Tabela 11	Precisão intermediária e exatidão obtidas para a genisteína utilizando método cromatográfico descrito no item 5.2.	37
Tabela 12	Limite de quantificação e detecção obtidos para daidzeína utilizando método cromatográfico descrito no item 5.2.	38
Tabela 13	Limite de quantificação e detecção obtidos para genisteína utilizando método cromatográfico descrito no item 5.2.	39
Tabela 14	Teor de daidzeína e genisteína no extrato seco de soja.	47
Tabela 15	Resultados das análises dos pós e granulados.	49
Tabela 16	Granulometria dos pós e granulados.	50
Tabela 17	Resultados de peso médio, dureza, espessura, desintegração e friabilidade.	53
Tabela 18	Teor de daidzeína e genisteína nas formulações GU1 a GU5 e CD1.	54
Tabela 19	Porcentagens de daidzeína dissolvida em diferentes meios de dissolução.	56
Tabela 20	Porcentagens de genisteína dissolvida em diferentes meios de dissolução	57
Tabela 21	Análise de variância Daidzeína 60 minutos.	59
Tabela 22	Análise de variância Daidzeína 90 minutos.	61
Tabela 23	Análise de variância Genisteína 60 minutos.	63
Tabela 24	Análise de variância Genisteína 90 minutos.	66
Tabela 25	Comparação da porcentagem de daidzeína dissolvida entre as formulações por tempo.	70

Tabela 26 Comparação da porcentagem de genisteína dissolvida entre as formulações por tempo.

70

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fases do processo de compressão.	6
Figura 2	Estruturas químicas das agliconas e glicosídeos de isoflavonas.	11
Figura 3	GTB usado na análise de fluxo (A) e na análise de ângulo de repouso (B).	21
Figura 4	Esquema das etapas de granulação úmida e compressão direta.	23
Figura 5	Cromatograma do placebo.	33
Figura 6	Cromatograma padrão de daidzeína e genisteína.	33
Figura 7	Curva de calibração da daidzeína (média de 3 determinações).	34
Figura 8	Curva de calibração da genisteína (média de 3 determinações).	35
Figura 9	Curvas de DSC do extrato seco de soja, padrões daidzeína e genisteína.	39
Figura 10	Curvas de DSC e TG do extrato seco de soja.	41
Figura 11	Curvas DSC do extrato, amido de milho e mistura binária.	42
Figura 12	Curvas DSC do extrato, dióxido de silício sozinho e mistura binária.	43
Figura 13	Curvas DSC do extrato, estearato de magnésio e mistura binária.	44
Figura 14	Curvas DSC do extrato, fosfato dicálcico dihidratado e mistura binária.	45
Figura 15	Curvas DSC do extrato, lauril sulfato de sódio e mistura binária.	45
Figura 16	Curva DSC da mistura binária extrato e lauril sulfato de sódio e curva TG do lauril sulfato de sódio.	46
Figura 17	Distribuição de tamanho das partículas das formulações estudadas.	51
Figura 18	Fotomicrografias de pós e granulados estudados: (A) extrato seco de soja, (B) granulado da formulação GU5, (C) mistura de pós da formulação CD1.	52
Figura 19	Comprimidos de isoflavona obtidos pela formulação GU3.	55
Figura 20	Comparação de cor entre os meios água com 0,5% de LSS (lado esquerdo) e HCl 0,1 mol/L (lado direito) ao final de 24h.	58

Figura 21	Superfície de resposta referente à influência das variáveis “concentração de lauril sulfato de sódio” e “volume do meio” sobre a concentração de daidzeína dissolvidas em 60 minutos do ensaio de dissolução.	60
Figura 22	Superfície de resposta referente à influência das variáveis “aparato” e “rotações” sobre a concentração de daidzeína dissolvidas em 60 minutos do ensaio de dissolução.	61
Figura 23	Superfície de resposta referente à influência das variáveis “concentração de lauril sulfato de sódio” e “volume do meio” sobre a concentração de daidzeína dissolvidas em 90 minutos do ensaio de dissolução.	62
Figura 24	Superfície de resposta referente à influência das variáveis “aparato” e “rotações” sobre a concentração de daidzeína dissolvidas em 90 minutos do ensaio de dissolução.	63
Figura 25	Superfície de resposta referente à influência das variáveis “concentração de lauril sulfato de sódio” e “volume do meio” sobre a concentração de genisteína dissolvidas em 60 minutos do ensaio de dissolução.	65
Figura 26	Superfície de resposta referente à influência das variáveis “aparato” e “rotações” sobre a concentração de genisteína dissolvidas em 60 minutos do ensaio de dissolução.	65
Figura 27	Superfície de resposta referente à influência das variáveis “concentração de lauril sulfato de sódio” e “volume do meio” sobre a concentração de genisteína dissolvidas em 90 minutos do ensaio de dissolução.	67
Figura 28	Superfície de resposta referente à influência das variáveis “aparato” e “rotações” sobre a concentração de genisteína dissolvidas em 90 minutos do ensaio de dissolução.	67
Figura 29	Superfície de resposta referente à influência das variáveis “concentração de lauril sulfato de sódio” e “rotações” sobre a concentração de genisteína dissolvidas em 90 minutos do ensaio de dissolução.	68
Figura 30	Curvas dos perfis de dissolução de daidzeína das formulações.	71
Figura 31	Curvas dos perfis de dissolução de genisteína das formulações.	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CD	Compressão Direta
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
F	Teste de Hipóteses
GL	Grau de Liberdade
GU	Granulação Úmida
HCl	Ácido Clorídrico
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LSS	Lauril Sulfato de Sódio
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
MQ	Média dos Quadrados
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
P	Significância Estatística

R <sup>2</sup>	Coeficiente de Correlação
rpm	Rotações por Minuto
SQ	Soma dos Quadrados
TG	Termogravimetria
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1	FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS ORAIS	3
<b>2.1.1</b>	<b>Estudo de pré-formulação</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Comprimidos</b>	<b>5</b>
2.1.2.1	Formas de obtenção de comprimidos	6
2.1.2.1.1	<i>Compressão direta</i>	6
2.1.2.1.2	<i>Granulação úmida</i>	7
2.1.2.2	Vantagens dos comprimidos	7
2.1.2.3	Excipientes	8
2.2	CONTROLE DE QUALIDADE	8
<b>2.2.1</b>	<b>Controle da qualidade microbiológica</b>	<b>8</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Controle de qualidade físico-químico</b>	<b>9</b>
2.3	ISOFLAVONAS DA SOJA	9
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	12
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
4.1	MATERIAS	13
<b>4.1.1</b>	<b>Equipamentos e Acessórios</b>	<b>13</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Reagentes e Produtos</b>	<b>14</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Matérias-primas</b>	<b>14</b>
4.2	MÉTODOS	15
<b>4.2.1</b>	<b>Análise microbiológica</b>	<b>15</b>

<b>4.2.2</b>	<b>Desenvolvimento e validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de genisteína e daidzeína.</b>	16
4.2.2.1	Curva de calibração	18
4.2.2.2	Precisão, Repetibilidade, Exatidão	18
4.2.2.3	Robustez	18
4.2.2.4	Limites de quantificação e detecção	19
<b>4.2.3</b>	<b>Estudo de pré-formulação</b>	19
4.2.3.1	Análise térmica	19
4.2.3.1.1	<i>Mistura binária</i>	19
4.2.3.1.2	<i>Termogravimetria (TG)</i>	19
4.2.3.1.3	<i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	19
4.2.3.2	Determinação do teor do extrato seco de soja	20
4.2.3.3	Propriedades dos pós e granulados	20
4.2.3.4	Métodos de obtenção dos comprimidos	22
4.2.3.5	Testes físicos dos comprimidos	25
4.2.3.5.1	<i>Determinação do Peso Médio</i>	25
4.2.3.5.2	<i>Determinação da Dureza</i>	25
4.2.3.5.3	<i>Espessura</i>	25
4.2.3.5.4	<i>Determinação da Friabilidade</i>	26
4.2.3.5.5	<i>Determinação do Tempo de Desintegração</i>	26
4.2.3.6	Determinação do teor dos comprimidos	26
<b>4.2.4</b>	<b>Desenvolvimento da metodologia analítica para o método de dissolução</b>	26
4.2.4.1	Ensaio de solubilidade	26
4.2.4.2	Ensaio de dissolução	27
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	30
5.1	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	30
5.2	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA DETERMINAÇÃO DE GENISTEÍNA E DAIDZEÍNA	32
<b>5.2.1</b>	<b>Verificação da precisão e exatidão</b>	35

5.2.1.1	Daidzeína	35
5.2.1.2	Genisteína	36
<b>5.2.3</b>	<b>Verificação dos limites de quantificação e detecção para daidzeína e genisteína</b>	<b>38</b>
5.2.3.1	Limites de Quantificação e Detecção para a daidzeína e genisteína	38
5.3	ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO	39
<b>5.3.1</b>	<b>Análise térmica</b>	<b>39</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Teor de daidzeína e genisteína no extrato seco de soja</b>	<b>47</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Formulações de comprimidos</b>	<b>48</b>
5.3.3.1	Análise dos pós e granulados	48
5.3.3.2	Análise dos parâmetros físicos dos comprimidos	53
5.4	DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA MÉTODO DE DISSOLUÇÃO	55
<b>5.4.1</b>	<b>Ensaio de solubilidade</b>	<b>55</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Planejamento fatorial</b>	<b>59</b>
5.4.2.1	Daidzeína	59
5.4.2.1.1	<i>Coleta no tempo 60 minutos</i>	59
5.4.2.1.2	<i>Coleta no tempo 90 minutos</i>	61
5.4.2.2	Genisteína	63
5.4.2.2.1	<i>Coleta no tempo 60 minutos</i>	63
5.4.2.2.2	<i>Coleta no tempo 90 minutos</i>	66
<b>5.4.3</b>	<b>Perfil de dissolução das formulações desenvolvidas</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A partir dos usos em medicina popular e as inúmeras comprovações científicas de propriedades farmacológicas, o interesse na utilização de medicamentos fitoterápicos tem aumentado. Com esse aumento, foram criadas normas e exigências legais de controle de qualidade deste tipo de medicamento, como a RDC n. 48 de 16 de março de 2004. Para a adequação às exigências cada vez maiores, e mais rigorosas, tornou-se imprescindível o desenvolvimento farmacotécnico de medicamentos fitoterápicos, além de métodos de controle de qualidade (PALMA et al., 2002; BRASIL, 2004).

O desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas utilizando matéria-prima vegetal é complexo, pois geralmente possuem propriedades desfavoráveis, como fluxo pobre e baixa compressibilidade (PALMA et al., 2002). A via oral é a mais utilizada para administração de medicamentos principalmente na forma farmacêutica de comprimido, os quais representam dois terços do mercado mundial de medicamentos (ALDERBORN, 2005; WU; SEVILLE, 2009). A produção de comprimidos é um processo complexo que envolve um grande número de variáveis, como propriedades do produto, composição da formulação, escolha do processo (VENKATARAM et al., 1996). Portanto, o estudo das propriedades do fármaco e planejamento de formulações são etapas essenciais para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica de qualidade (WELLS, 2005).

Dentre as matérias-primas vegetais com ações farmacológicas de interesse para obtenção de formas farmacêuticas sólidas estão as isoflavonas de soja. As isoflavonas são flavonóides encontrados em abundância nos grãos de soja (*Glycine max* L.). São denominadas fitoestrógenos devido à sua estrutura química semelhante ao estrógeno (hormônio feminino) e ação fracamente estrogênica. Devido a essa ação estrogênica elas têm sido bastante utilizadas como alternativa às terapias de reposição hormonais convencionais, pois reduzem os sintomas da menopausa e provocam menos efeitos colaterais (APERS et al., 2004; LEE et al., 2007). As isoflavonas também possuem ação em várias outras patologias, como no combate a cânceres hormônio-dependentes, doenças cardiovasculares e osteoporose. Essas substâncias ainda possuem atividade antioxidante e anti-fúngica (PARK et al., 2001; LEE et al., 2007; CÉSAR et al., 2007).

Campos e colaboradores (2006) e César e colaboradores (2007) relatam a alta variabilidade de teores de isoflavonas em cápsulas e comprimidos de isoflavona comercializadas, demonstrando a deficiência de desenvolvimento farmacotécnico e controle de qualidade adequados.

Diante das considerações acima este trabalho propõe o desenvolvimento farmacotécnico e analítico apropriado de formas farmacêuticas sólidas de isoflavona de soja, utilizando como matéria-prima extrato seco de soja padronizado.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS ORAIS

#### 2.1.1 Estudo de pré-formulação

A pré-formulação é a primeira etapa no desenvolvimento racional de formas farmacêuticas. No desenvolvimento de formulações é essencial conhecer as características físicas e químicas do fármaco e dos excipientes. É importante que a forma farmacêutica tenha estabilidade e biodisponibilidade adequadas, sendo que tanto o fármaco como os excipientes podem influenciar estas características. (ALDERBORN, 2005; WELLS, 2005; VIANA et al, 2006).

Para obtenção de formas farmacêuticas sólidas adequadas é essencial que se cumpram algumas etapas ao longo do desenvolvimento, como análise do tamanho das partículas, compatibilidade entre os componentes, estabilidade, fluxo de pós, compressibilidade, avaliação das características físico-químicas, polimorfismo, aparência visual (WELLS, 2005; CURY; SILVA JÚNIOR; CASTRO, 2008).

Os tamanhos de partículas do fármaco e excipientes terão influência tanto nas características físicas do medicamento como na sua eficácia farmacológica. O tamanho de partícula influi também na produção das formas farmacêuticas sólidas. Existem etapas na produção de comprimidos e cápsulas que controlam a massa de fármaco e adjuvantes farmacotécnicos mediante preenchimento de um determinado volume. Qualquer fator que interfira na uniformidade do preenchimento pode alterar a massa de fármaco contida no comprimido ou na cápsula, comprometendo a uniformidade de conteúdo do produto final. Pós com diferentes tamanhos de partícula apresentam diferentes propriedades de fluxo e empacotamento, conseqüentemente gerando volumes de pó encapsulados ou comprimidos irregulares. Para evitar esse tipo de problema durante a produção do medicamento, os tamanhos de partícula do fármaco e excipientes devem ser avaliados durante a fase de pré-formulação do produto (STANIFORTH, 2005; EMSHANOVA, 2008).

O fluxo de pós é um parâmetro importante a ser avaliado na pré-formulação, pois influencia nas etapas de mistura, granulação, secagem, calibração dos grânulos, compressão e enchimento de cápsulas. Fluxo livre é fundamental para alimentação de equipamentos, uniformidade na dose, evitar excesso de ar retido

entre as partículas (impedindo laminação), evitar excesso de partículas finas que podem gerar contaminação cruzada e do manipulador (STANIFORTH, 2005; SCHNEIDER; SINKA; COCKS, 2007).

Velocidade de fluxo é uma medida direta do fluxo de pós. Ela é medida verificando o tempo que uma determinada massa, geralmente 100g, leva para passar por um funil com um diâmetro de orifício previamente definido. O diâmetro do orifício do funil pode variar, sendo este um parâmetro fundamental na análise da velocidade de fluxo (USP 30, 2007).

O ângulo de repouso é o ângulo formado pelo pó quando ele escoar livremente por um funil com um diâmetro de orifício previamente definido e cai por uma superfície plana e lisa (ANSEL; POPOVICH; ALLEN Jr, 2007; USP 30, 2007).

Compressibilidade é a capacidade da matéria-prima de sofrer redução de volume quanto submetida à pressão. Os dois mecanismos principais de redução de volume durante a compressão são a fragmentação e a deformação plástica. Os materiais se comportam em graus diferentes de fragmentação e deformação plástica durante a compressão. Geralmente o parâmetro de compressibilidade de pós farmacêuticos é determinado pela relação entre a pressão aplicada e o volume compactado (ZHAO; BURT; MILLER, 2006; SINKA et al., 2009). Um índice similar a compressibilidade foi determinado por Hausner, no qual o fluxo também é avaliado indiretamente utilizando a densidade aparente e a densidade de compactação do pó (WELLS, 2005; USP 30, 2007).

O estudo das propriedades físicas e químicas do fármaco é importante para obtenção de um medicamento estável e eficaz. Essas propriedades, como solubilidade, dissolução, tamanho da partícula, formas polimórficas, interações entre fármaco e excipientes, coeficiente de partição, constante de ionização, higroscopicidade e propriedades organolépticas, podem ter efeitos sobre a disponibilidade fisiológica e estabilidade física e química do fármaco (YORK, 2005).

O estudo de compatibilidade são testes fundamentais a serem avaliados no desenvolvimento de formulações. As técnicas termoanalíticas são de grande auxílio nesses testes, pois possibilitam a triagem de formulações mais estáveis em menor tempo que os estudos de estabilidade convencionais (BAZZO; SILVA, 2005).

Nesse sentido, a análise térmica é um conjunto de métodos pelos quais as propriedades de uma amostra é medida em função da temperatura e / ou do tempo, enquanto a amostra está submetida a um programa de temperatura controlado, sob

uma atmosfera especificada. Possibilita estudar interações entre o princípio ativo e os excipientes, a cinética de degradação e a estabilidade entre os componentes da formulação. Dentre os métodos conhecidos, os mais empregados são a calorimetria exploratória diferencial e a termogravimetria (RODRIGUES et al., 2008).

### **2.1.2 Comprimidos**

Comprimidos são formas farmacêuticas sólidas constituídas por um ou mais princípios ativos e excipientes (substâncias que auxiliam na sua formação e não possuem atividade farmacológica) agrupados em uma formulação, sendo obtidos pela compressão da formulação completa (ALDERBORN, 2005; SHAO, ROWE, YORK, 2007).

O processo de compressão envolve três fases principais (Figura 1): alimentação, compactação e ejeção. Na alimentação, o pó/granulado flui do funil alimentador preenchendo a matriz pela força da gravidade, e o punção inferior veda a parte inferior da matriz, não deixando o conteúdo sair. O preenchimento da matriz deve ser uniforme para que os comprimidos sejam uniformes. A compactação é a etapa em que os punções, inferior e superior, movimentam-se na matriz até exercerem uma força máxima no material particulado dentro da matriz, formando o comprimido. Após a compactação vem a fase de ejeção na qual o punção inferior sobe, ejetando o comprimido da matriz. As propriedades do fármaco e dos adjuvantes influenciam diretamente nas fases do processo de compressão, afetando a qualidade do produto final (BONACUCINA et al., 2007; WU et al., 2008; SINKA et al., 2009).

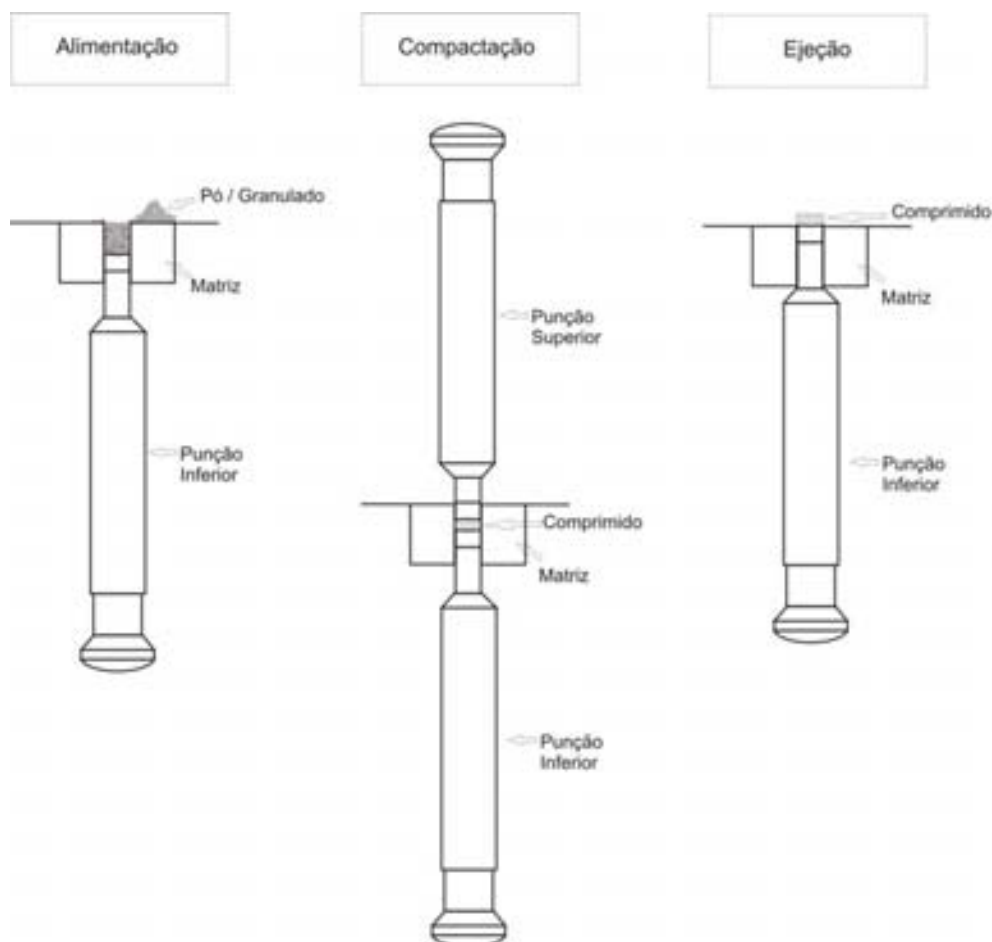


Figura 1. Fases do processo de compressão.

### 2.1.2.1 Formas de obtenção de comprimidos

#### 2.1.2.1.1 Compressão direta

A compressão direta é um processo contemporâneo que tem crescido nos últimos anos devido ao aparecimento de mais e melhores excipientes para uso na compressão direta de medicamentos. Este processo oferece vantagens, como o tempo reduzido, por ter menos operações unitárias, podendo levar à obtenção de comprimidos muitas vezes com melhor estabilidade, visto que a mistura de pós não passa por etapas de umectação, secagem em temperaturas elevadas ou granulação seca. Porém, para que esse processo possa ser utilizado, o fármaco deve ter características adequadas como boa fluidez, compressibilidade e representar uma pequena porcentagem do comprimido. Isto torna a seleção de excipientes extremamente importante, visto que eles devem ser apropriados para fornecer

fluidez, homogeneidade da mistura, compressibilidade, estabilidade física e química, compatibilidade com o ativo da formulação e promover dissolução adequada. (ZHANG, LAW, CHAKRABARTI, 2003; ALDERBORN, 2005; EMSHANOVA, 2008)

#### 2.1.2.1.2 Granulação úmida

A granulação úmida é um processo tradicional, no qual se faz com que as partículas primárias se aglomerem formando grânulos. Na forma mais convencional desse processo é feita a tamisação dos componentes (fármaco e adjuvantes) na forma de pós, tentando delimitar o tamanho máximo das partículas, posteriormente é feita a mistura desses componentes, então é adicionado um líquido aglutinante, e em seguida a massa formada é homogeneizada e granulada. Os grânulos úmidos são colocados em estufa para secagem (SUMMERS, AULTON, 2005; LAMOLHA, SERRA, COCKS, 2007; BACHER et al., 2008).

Apesar de envolver mais etapas, a granulação úmida confere melhor propriedades de fluxo e compactação da formulação, previne a segregação dos constituintes durante as etapas posteriores do processo, minimiza as variações de granulometria de diferentes lotes de matérias-primas, reduz os possíveis riscos à saúde causados pelo manuseio e inalação de pós finos. Por serem mais densos, os grânulos ocupam menor volume por unidade de peso, sendo mais convenientes para estocagem. Outra vantagem é econômica, visto que geralmente são utilizadas matérias-primas mais baratas que para compressão direta e o fármaco pode representar uma porcentagem mais alta do comprimido (SUMMERS, AULTON, 2005; LAMOLHA, SERRA, COCKS, 2007; BACHER et al., 2008).

#### 2.1.2.2 Vantagens dos comprimidos

Dentre as vantagens apresentadas por essa forma farmacêutica, podem ser citadas a alta aceitação, via conveniente (não invasiva) e segura para administração de medicamentos. Comprimidos geralmente possuem melhor estabilidade química e física em relação às formas líquidas, os processos de preparo permitem maior precisão da dose e menor variabilidade do conteúdo, são de fácil manuseio e podem ser obtidos de modo versátil levando em consideração os modos de uso. Podem ser produzidos em grande escala por processos de produção robustos e com sistema eficaz de controle de qualidade, com custo relativamente baixo. Pode ainda ser

levada em conta a questão estética do comprimido, que pode ser preparado com várias cores e formatos (ALDERBORN, 2005; ANDO et al., 2007).

### 2.1.2.3 Excipientes

Excipientes ou adjuvantes farmacotécnicos, são, de forma simplificada, matérias-primas que auxiliam na formação dos medicamentos e não possuem atividade farmacológica. Apesar de serem considerados inertes, alguns excipientes podem ter ação, como o manitol, que é utilizado como diluente em formas sólidas, e em grandes quantidades tem efeito laxativo (VILLANOVA; SÁ, 2009).

Os excipientes são fundamentais no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas, por serem responsáveis pela formação da forma farmacêutica. Excipientes influenciam e muitas vezes garantem a estabilidade física e química, a biodisponibilidade adequada e uma boa aparência visual. Eles possuem várias funções como diluentes, tensoativos, aglutinantes, lubrificantes, deslizantes, desintegrantes, antioxidantes, agentes modificadores de liberação, agentes de revestimento, plastificantes, edulcorantes, corantes, flavorizantes (ALDERBORN, 2005; VIANA et al, 2006; VILLANOVA; SÁ, 2009).

## 2.2 CONTROLE DE QUALIDADE

O controle de qualidade visa a fabricação de produtos com qualidade, de forma sistemática e uniforme. Para garantir que todo lote de medicamento tenha eficácia semelhante, é essencial estabelecer especificações adequadas para o medicamento em questão. Como a qualidade é requisito indispensável em todas as fases do processo de fabricação, o controle das matérias-primas e da produção (processo) é o melhor método para manter um alto nível de qualidade na totalidade dos produtos semi-elaborados e acabados (KOROLKOVAS, 1984).

### 2.2.1 Controle da qualidade microbiológico

Grande parte das matérias-primas de uso farmacêutico apresenta-se contaminada por algum microorganismo. Os produtos de origem natural geralmente são mais contaminados que os de origem sintética, já que nas matérias-primas sintéticas a carga microbiana pode ter sido reduzida durante o processo de obtenção por efeito do calor, de valores extremos do pH ou pelo uso de solventes orgânicos. A determinação da carga microbiana nessas matérias-primas, em que a análise

microbiológica se faz necessária, é realizada, muitas vezes, de forma direta, utilizando os procedimentos de contagem de microorganismos viáveis (HODGES, 2005).

### **2.2.2 Controle de qualidade físico-químico**

Para garantir que uma forma farmacêutica tenha a eficácia desejada é preciso que ela cumpra parâmetros físico-químicos relacionados ao produto final. O controle de qualidade físico-químico dos comprimidos visa garantir que eles possuam as características adequadas para disponibilizar o fármaco para absorção. A dissolução é um método muito utilizado para avaliar a forma como o comprimido libera o princípio ativo no meio, garantindo a biodisponibilidade do medicamento (RODRIGUES et al., 2008).

Entre os métodos utilizados para avaliar a qualidade físico-química dos comprimidos estão: análise do teor de princípio(s) ativo(s), peso médio, dureza, espessura, desintegração, friabilidade, dissolução e aparência física (STULZER; SILVA, 2007).

Grande parte dos métodos utilizados na avaliação de comprimidos está descritos em compêndios oficiais (Farmacopéias). No entanto, há casos em que não há a descrição, sendo necessário que os mesmos sejam desenvolvidos e validados, segundo a Resolução – RE nº 899 (2003), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

## **2.3 ISOFLAVONAS DA SOJA**

Isoflavonas são flavonóides encontrados em abundância nos grãos de soja (*Glycine max* L.). As isoflavonas são os fitoestrógenos mais comuns, possuindo uma estrutura semelhante ao estrógeno (APERS et al., 2004; LEE et al., 2007). As isoflavonas exercem funções biológicas semelhantes ao estrógeno, com ação fracamente estrogênica, sendo utilizadas no tratamento dos sintomas da menopausa como alternativa às terapias de reposição hormonais convencionais que provocam diversos efeitos colaterais. Estudos têm demonstrado que as isoflavonas reduzem os sintomas indesejáveis decorrentes da menopausa sem provocar a alta incidência de efeitos colaterais provocados pela terapia de reposição hormonal convencional. Há também um aumento no interesse de outros benefícios potenciais das isoflavonas, como em vários tipos de cânceres hormônio-dependentes, doenças

cardiovasculares, e osteoporose. Essas substâncias ainda possuem atividade antioxidante e anti-fúngica (PARK et al., 2001; LEE et al., 2007; CÉSAR et al., 2007).

As isoflavonas podem agir de diferentes formas dependendo do tecido, apresentando afinidade por receptores específicos. Suas principais ações são como estrógenos e anti-estrógenos, reguladora de atividade de proteína (principalmente de tirosina quinases, ligada ao desenvolvimento de câncer), reguladora do ciclo celular e antioxidante (ESTEVES; MONTEIRO, 2001). Na presença de estrógenos as isoflavonas atuam como antiestrógenos, competindo pelos sítios de ligação nos receptores de estrógenos presentes na célula. Na ausência do estrógeno, como na menopausa, as isoflavonas possuem efeito estrogênico e substituem o hormônio que se apresenta em baixo nível, aliviando os sintomas da menopausa (DESPAIGNE, 2001).

As principais isoflavonas (Figura 2) da soja são as formas agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína, que ocorrem também na forma de glicosídeos, daidzina, genistina e glicitina, respectivamente. A genisteína e a daidzeína são as formas mais abundantes, representando de 50 a 90% dos flavonóides encontrados e possuem maior atividade biológica (PARK et al., 2001; PRABHAKARAN; HUI; PERERA, 2006; CÉSAR et al., 2007).

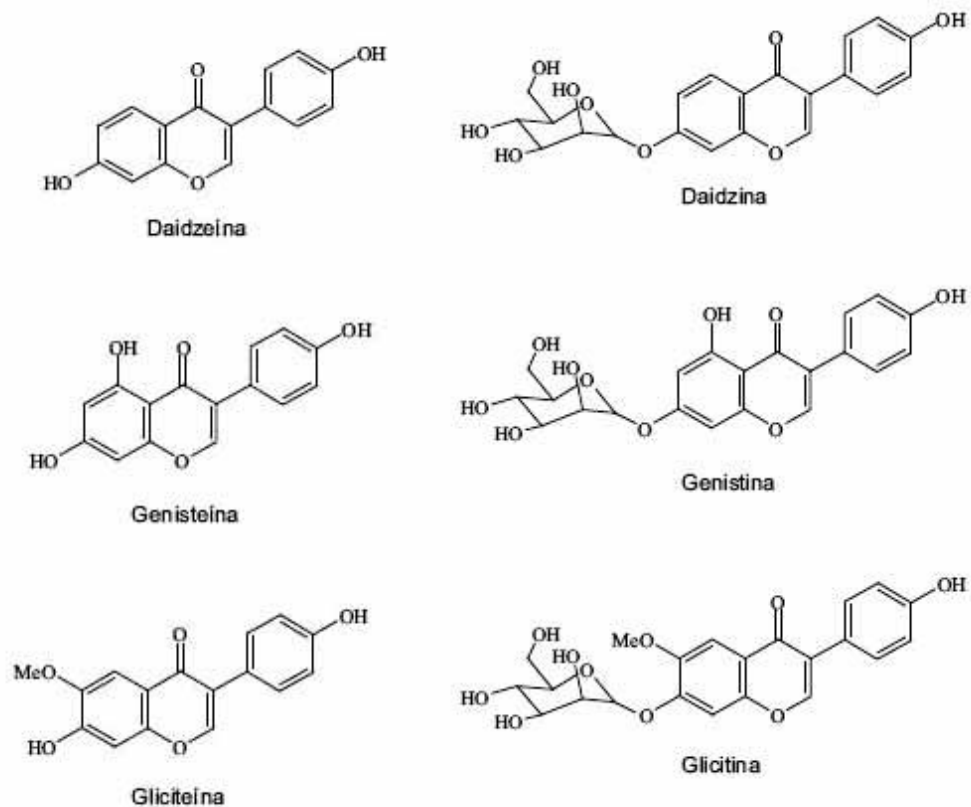


Figura 2. Estruturas químicas das agliconas e glicosídeos de isoflavonas.

As isoflavonas quando ingeridas podem ser hidrolisadas em parte pelo suco gástrico liberando as agliconas, como daidzeína e genisteína, e a grande parte é absorvida diretamente no intestino. A eliminação geralmente ocorre via renal, semelhante aos estrógenos endógenos (KNIGHT; EDEN, 1995; TAPIERO; BA; TEW, 2002).

Outro fator importante é que os teores de isoflavonas em suas diferentes formas variam com o cultivo e as condições climáticas, sendo de fundamental importância o monitoramento dos teores de cada matéria-prima. Tal variação diminui com o uso de extrato padronizado. (PARK et al., 2001; PRABHAKARAN; HUI; PERERA, 2006; CÉSAR et al., 2007).

Em dezembro de 2009 a isoflavona de soja foi um dos fitoterápicos aprovados pelo ministério da saúde para ser distribuída pelo Sistema Único de Saúde, para reduzir os sintomas da menopausa (BRASIL, 2009).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver formas farmacêuticas sólidas de uso oral de isoflavona de soja e métodos de análise da matéria-prima, do granulado e do produto acabado (comprimidos).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudo de pré-formulação e desenvolvimento de formulações de comprimidos de isoflavona de soja.

Desenvolver metodologia analítica para a determinação quantitativa e qualitativa das isoflavonas daidzeína e genisteína por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Aplicar a metodologia desenvolvida no controle de qualidade matéria-prima e dos produtos acabados desenvolvidos.

Desenvolver metodologia de dissolução para analisar os comprimidos desenvolvidos, avaliando o perfil de cada formulação.

Comparar as formulações desenvolvidas, quanto a parâmetros físicos, teor e dissolução.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAS

#### 4.1.1 Equipamentos e Acessórios

- Balança Analítica – Gehaka (Modelo AG 200);
- Balança Semi-Analítica – Tecnal (Modelo B TEC 1300);
- Balança de infravermelho – GEHAKA (Modelo IV 2000);
- Banho-Maria – Fisatom (Mod. 552);
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – Varian;
- Centrífuga – Sigma (Modelo 3-18K);
- Deionizador – Quimis ;
- Dissolutor – Varian (Modelo Vankel 7000, nº série 1-6353-0802, R.S. 001800);
- Estufa – Nova ética
- Lavadora Ultra-sônica – Unique (Modelo USC 1400, nº série 238210);
- Milli Q Gradiente – Millipore (nº série B2EN 38775<sup>a</sup>);
- Mini incubadora – Marconi (Modelo MA 410);
- Paquímetro Fischer Scientific;
- Aparelho para determinação do ângulo de repouso – Erweka, modelo GTB;
- Desintegrador – Nova Ética, modelo 301AC;
- Calorímetro diferencial exploratório por fluxo de calor, Shimadzu DSC-60A, dotado de controlador de fluxo para gás de purga (N<sub>2</sub>) FC-60A, integrador TA-60WS e software de controle e avaliação TA-60WS;
- Termobalança Shimadzu DTG-60, dotado de controlador de fluxo para gás de purga (N<sub>2</sub>) FC-60A, integrador TA-60WS e software de controle e avaliação TA-60WS;
- Friabilômetro – Nova Ética (modelo 300);
- Misturador em V – Lawes, modelo 6-10 L;
- Compressora – Lawes 2000 08-PSC MANU;
- Estufa de secagem de pós – Lawes;
- Granulador cônico – Lawes (modelo GS Lab);
- Durômetro – Nova ética (modelo 298 – DGP);
- Drageadora – Lawes;
- Densímetro de pós – Erweka ( modelo SVM 203).

#### 4.1.2 Reagentes e Produtos

- Ácido Clorídrico;
- Ácido Acético Glacial;
- Acetato de Sódio Monohidratado;
- Acetonitrila;
- Lauril Sulfato de Sódio;
- Metanol (Grau CLAE);
- Tween® 20;
- Tween® 80;
- Meio ágar caseína-soja;
- Meio ágar sabouraud;
- *Escherichia coli* cepa ATCC 25922;
- *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923;
- *Candida albicans* cepa ATCC 10231;
- *Aspergillus niger* cepa ATCC 16404.

#### 4.1.3 Matérias-primas

- Extrato seco de soja padronizado em 40% de isoflavona;
- Daidzeína substância química de referência – Sigma-Aldrich (Lote 048K4032);
- Genisteína substância química de referência – LC Laboratories (Lote G-6055);
- Celulose microcristalina PH-102;
- Croscarmelose sódica;
- Amido de milho;
- Dióxido de titânio;
- Dióxido de silício;
- Estearato de magnésio;
- Fosfato dicálcico anidro;
- Hidroxipropilmetilcelulose (Opadry YS-1-7006®);
- Lactose M-200;
- Polietilenoglicol 6000;
- Lauril sulfato de sódio;
- Polyplasdne XL-10®;
- Polyplasdne XL®;

- Metabissulfito de sódio;
- Butilhidroxitolueno;
- Povidona;
- Talco;
- Corante óxido de ferro amarelo;
- Corante vermelho ponceau;
- Corante amarelo tartrazina.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Análise microbiológica

A análise microbiológica do extrato seco de soja foi realizada junto com um teste de recuperação com cepas de bactérias e fungos disponíveis, para verificar se o extrato não impede o crescimento microbiológico (USP 30, 2007).

Na análise microbiológica e teste de recuperação do extrato seco de soja as bactérias *Escherichia coli* cepa ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 foram repicadas em meio ágar caseína-soja inclinado e incubadas a 35°C por 48 horas. Os fungos *Candida albicans* cepa ATCC 10231 e *Aspergillus niger* cepa ATCC 16404 foram repicados em ágar sabouraud e incubados a 24°C por 96 horas. Os microorganismos do meio ágar caseína-soja inclinado foram transferidos para um tubo contendo caldo caseína-soja com auxílio de uma alça estéril.

Foi retirada uma alíquota de 1 mL das suspensões, transferida para uma placa de petri e acrescentados 20 mL de ágar caseína-soja fundido e resfriado a 45°C nas placas contendo inóculo bacteriano. As placas contendo fungos receberam ágar sabouraud fundido e resfriado a 45°C. O plaqueamento foi realizado em duplicata para cada diluição.

O extrato foi diluído em caldo de soja triptona com polissorbatato e lecitina de soja na proporção 1:10, respectivamente.

As bactérias foram incubadas a 35°C por 48 horas e os fungos a 24°C por 96 horas. Após a incubação foi verificada a contagem células por placa, através da média aritmética para cada diluição em teste.

No primeiro grupo (grupo teste) foi adicionado 1 mL do extrato diluído no método de análise na placa de petri, em seguida um 1 mL de inóculo, 20 mL de

ágar fundido e resfriado a 45°C. Homogeneizou-se com movimento em 8 e colocadas em repouso até solidificar. As placas foram incubadas invertidas.

No segundo grupo (grupo teste do diluente) foi adicionado 1 mL do diluente na placa de petri, em seguida um 1 mL de inóculo, 20 mL de ágar fundido e resfriado a 45°C. Homogeneizou-se com movimento em 8 e colocadas em repouso até solidificar. As placas foram incubadas invertidas.

No terceiro grupo (controle positivo) foi adicionado 1 mL de inóculo na placa de petri, 20 mL de ágar fundido e resfriado a 45°C. Homogeneizou-se com movimento em 8 e colocadas em repouso até solidificar. As placas foram incubadas invertidas.

No quarto grupo (controle negativo) foi adicionado 1 mL do diluente na placa de petri, 20 mL de ágar fundido e resfriado a 45°C. Homogeneizou-se com movimento em 8 e colocadas em repouso até solidificar. As placas foram incubadas invertidas.

No quinto grupo (controle do produto) foi adicionado 1 mL do extrato diluído na placa de petri, 20 mL de ágar fundido e resfriado a 45°C. Homogeneizou-se com movimento em 8 e colocadas em repouso até solidificar. As placas foram incubadas invertidas.

Após o tempo de incubação as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas manualmente nas placas.

Cada grupo deve cumprir os critérios específicos, sendo que o 1º grupo deve apresentar crescimento igual ou superior a 70% em relação ao observado no controle positivo (grupo 3); o 2º grupo deve apresentar crescimento igual ou superior a 70% em relação ao observado no controle positivo (grupo 3); o 3º grupo deve apresentar crescimento conforme a padronização feita anteriormente; o 4º grupo (controle negativo) não deve apresentar crescimento; o 5º grupo por ser o controle do produto não deve apresentar crescimento (USP 30, 2007).

#### **4.2.2 Desenvolvimento e validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de genisteína e daidzeína.**

No desenvolvimento do método para análise de genisteína e daidzeína por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram avaliadas diferentes condições cromatográficas conforme a Tabela 1, com o intuito de determinar as condições de

melhor desempenho do método que garantisse a quantificação e separação desses dois marcadores.

Em todas as condições demonstradas na Tabela 1 a fase estacionária utilizada foi uma coluna de fase reversa C18 150 mm x 4,6 mm x 5 µm, e o comprimento de onda foi 254 nm. Amostras de padrões primários de genisteína e daidzeína foram dissolvidas separadamente em metanol.

Tabela 1. Condições cromatográficas utilizadas para o desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência.

Método	Fase móvel	Proporção (v/v)	Fluxo (mL/min)	Modo	Detector	Temperatura	Volume de injeção
1	metanol com 1% de ácido acético: água com 1% de ácido acético	30:70	0,7	Isocrático	UV -VIS	40°C	10 µL
2	metanol com 1% de ácido acético: água com 1% de ácido acético	65:35	0,7	Isocrático	UV -VIS	40°C	10 µL
3	metanol com 1% de ácido acético: água com 1% de ácido acético:acetonitrila	64:34:2	0,7	Isocrático	UV -VIS	40°C	10 µL
4	metanol com 0,1% de ácido acético: água com 0,1% de ácido acético:acetonitrila	64:34:2	0,7	Isocrático	UV -VIS	40°C	10 µL
5	metanol com 0,1% de ácido acético: água com 0,1% de ácido acético:acetonitrila	64:34:2	0,7	Isocrático	UV -VIS	30°C	10 µL
6	metanol com 0,1% de ácido acético: água com 0,1% de ácido acético:acetonitrila	64:32:4	0,7	Isocrático	UV -VIS	30°C	10 µL

Após todos os métodos serem testados e avaliados quanto à simetria e resolução dos picos, tempos de retenção e largura das bases dos picos, o método escolhido foi submetido ao procedimento de validação seguindo os critérios de aceitação da Resolução – RE nº 899 (2003), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e ICH (2005).

#### 4.2.2.1 Curva de calibração

Para a construção das três curvas de calibração foram preparadas soluções estoque de daidzeína e genisteína pesando 10mg de cada padrão, posteriormente colocados em balões volumétricos separados de 10mL e completados os volumes com metanol. Partindo das soluções estoques foi preparada uma solução mãe utilizando balão volumétrico de 10mL, sendo pipetado 1mL de cada solução estoque e completando com metanol grau CLAE.

As diluições volumétricas para as curvas de calibração foram feitas, em duplicata, em vial a partir da solução mãe. As curvas de calibração foram realizadas em diferentes dias, sendo todas nas seguintes concentrações de ambos os padrões: 36,0 µg/mL; 32,5 µg/mL; 30,0 µg/mL; 24,0 µg/mL; 19,5 µg/mL; 15,0 µg/mL; 7,5 µg/mL; 3,0 µg/mL e 1,5 µg/mL.

A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação das três curvas de calibração.

#### 4.2.2.2 Precisão, Repetibilidade, Exatidão

A precisão foi avaliada quanto à repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (inter-corrída).

Para avaliar a repetibilidade, foram realizadas em CLAE nove determinações em três concentrações, baixa (1,5µg/mL), média (15,0µg/mL) e alta (30,0µg/mL), sendo cada concentração feita em triplicata para posterior cálculo estatístico. A precisão intermediária foi realizada por outro analista em dia diferente, sendo as análises feitas como na repetibilidade.

A exatidão foi avaliada pelo grau de concordância entre os resultados obtidos na repetibilidade e os valores estabelecidos como referência (Ribani et al, 2004).

#### 4.2.2.3 Robustez

Para avaliar a robustez do método, foram realizadas pequenas variações nos parâmetros analíticos do método cromatográfico para avaliar a susceptibilidade do método às variações analíticas.

Os parâmetros avaliados foram: temperatura, fluxo e pH da fase móvel. A temperatura utilizada no ensaio de robustez foi alterada de 30°C para 35°C. O fluxo da fase móvel foi modificado de 0,7mL/min para 0,6mL/min. E o pH da fase móvel foi alterado de 4,0 para 3,8.

#### 4.2.2.4 Limites de quantificação e detecção

Os limites de quantificação e detecção foram determinados pela análise em CLAE de soluções contendo concentrações decrescentes de daidzeína e genisteína até o menor nível determinável e detectável (ICH, 2005).

### 4.2.3 Estudo de pré-formulação

#### 4.2.3.1 Análise térmica

##### 4.2.3.1.1 *Mistura binária*

Para verificar possíveis interações do extrato seco de soja e vários excipientes, foram preparadas misturas binárias para serem submetidas à calorimetria exploratória diferencial (MURA et al., 1995).

As misturas binárias foram preparadas por meio de mistura física na proporção de 1:1 do extrato e de cada excipiente demonstrado na Tabela 2. Cada componente da mistura foi pesado separadamente e transferido para frasco de vidro âmbar. Todos os frascos contendo mistura binária foram agitados igualmente.

##### 4.2.3.1.2 *Termogravimetria (TG)*

Antes da análise por calorimetria exploratória diferencial o extrato seco de soja foi analisado por termogravimetria para avaliar o seu comportamento térmico. As condições desse teste foram velocidade de aquecimento de 10°C/min, faixa de aquecimento entre 25°C e 650°C, a composição e fluxo do gás de purga utilizado foi nitrogênio sob fluxo de 50mL/min.

##### 4.2.3.1.3 *Calorimetria exploratória diferencial (DSC)*

O equipamento foi previamente calibrado com índio e zinco, em termos de temperatura e valores de entalpia.

Foram submetidas à calorimetria exploratória diferencial as amostras de extrato seco de soja, excipientes, misturas binárias e as substâncias químicas de referência daidzeína e genisteína. Em cada cadinho foram pesadas as amostras com massa entre 1 e 3mg, os quais foram tampados e selados com selador próprio.

Dois cadinhos vazios foram tampados e selados para serem utilizados um como referência e outro como branco.

Os ensaios foram realizados utilizando velocidade de aquecimento de 10°C/min, faixa de aquecimento entre 25°C e 500°C, a composição e fluxo do gás de purga utilizado foi nitrogênio sob fluxo de 50mL/min.

#### 4.2.3.2 Determinação do teor do extrato seco de soja

O teor de daidzeína e genisteína do extrato seco de soja foi determinado de duas formas, sem hidrolisar e hidrolisando o extrato.

Na forma sem hidrolisar o extrato foi pesado, transferido para balão volumétrico, adicionado metanol e colocado em ultrassom por 20 minutos. A solução foi diluída para a concentração de 100 µg/mL de extrato, filtrada e analisada por CLAE, conforme item 4.2.2.

Na outra forma, o extrato foi submetido previamente a hidrólise ácida. Para a hidrólise ácida o extrato foi pesado, colocado em balão volumétrico, adicionado ácido clorídrico etanólico 3 mol/L e colocado sob agitação em banho-maria a 60°C com refluxo por 40 minutos. Após resfriar, o volume foi completado com ácido clorídrico etanólico 3 mol/L (CÉSAR et al., 2006; CÉSAR et al., 2007; YUAN et al., 2008). A solução foi filtrada e diluída com metanol para a concentração de 100 µg/mL de extrato e analisada por CLAE, conforme item 4.2.2.

#### 4.2.3.3 Propriedades dos pós e granulados

O fluxo da mistura de pós e dos granulados foi avaliado diretamente pela velocidade de escoamento e indiretamente pelo ângulo de repouso, no analisador de fluxo de pós e granulados GTB (Erweka) - Figura 3. Aproximadamente 40 g da amostra foram colocadas no funil com orifício de 15 mm de diâmetro, com agitação mecânica e leitura automática. Os experimentos foram feitos em triplicatas.

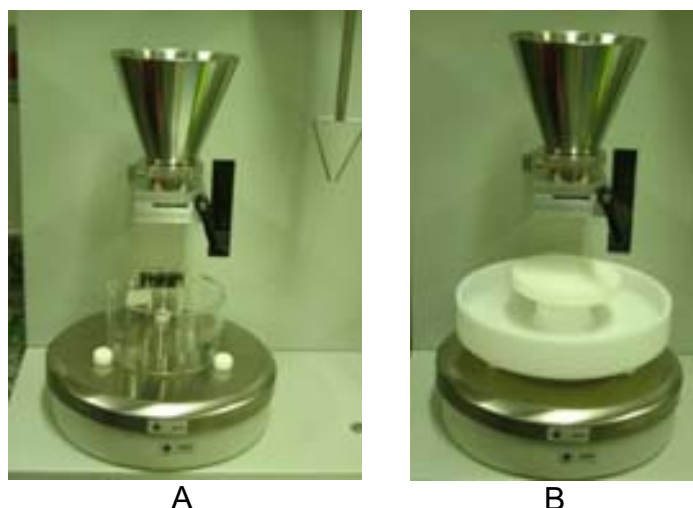


Figura 3. GTB usado na análise de fluxo (A) e na análise de ângulo de repouso (B).

A densidade da mistura de pós e dos granulados foi determinada em um densímetro de pós SVM 203 (Erweka). Para a determinação, 40 g da mistura de pós ou granulado foram pesadas e transferidas para a proveta calibrada do densímetro, onde o volume foi medido e a densidade aparente avaliada. A proveta foi submetida a uma seqüência de batidas e o volume final (densidade compactada) foi aferido. As densidades aparente e de compactação foram calculadas dividindo a massa colocada na proveta pelo volume medido.

Utilizando as densidades calculadas, aparente (bruta) e de compactação, a compressibilidade foi calculada pela seguinte equação:

$$C = \frac{dac - d0}{dac} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, C é a compressibilidade, dac é a densidade de compactação e d0 é a densidade aparente. Sendo o resultado obtido expresso em porcentagem (USP 30, 2007).

O índice de Hausner foi calculado pela equação abaixo:

$$IH = \frac{dac}{d0} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde, IH é o índice de Hausner, dac é a densidade de compactação e d0 é a densidade aparente (USP 30, 2007).

A umidade residual dos pós e granulados foi avaliada em triplicata utilizando balança de infravermelho GEHAKA. O extrato, granulado ou mistura de pós foi

acondiciona em prato metalizado 10 cm de diâmetro, de forma a preencher todo o fundo do recipiente. Foi utilizado o modo automático de secagem até que se atingisse peso constante à temperatura de 105°C (BORGES et al., 2005).

A granulometria foi avaliada colocando 50 g do extrato, mistura de pós ou granulado numa seqüência de tamises, com malhas de 1,4 mm, 1,0 mm, 0,5 mm, 0,25 mm e 0,125mm, que foram submetidos à agitação manual. A quantidade retida em cada tamis foi pesada e expressa em porcentagem.

#### 4.2.3.4 Métodos de obtenção dos comprimidos

Foram propostas cinco formulações de comprimidos revestidos de isoflavona 150 mg por granulação úmida (formulações GU1, GU2, GU3, GU4 e GU5) e uma formulação por compressão direta (formulação CD1) com o objetivo de avaliar o comportamento dos excipientes e do extrato seco de soja. Para cada formulação foi feito um piloto de aproximadamente 300 g.

As formulações por granulação úmida e compressão direta foram preparadas conforme esquema demonstrado na Figura 4. A Tabela 2 mostra os excipientes utilizados para cada formulação.

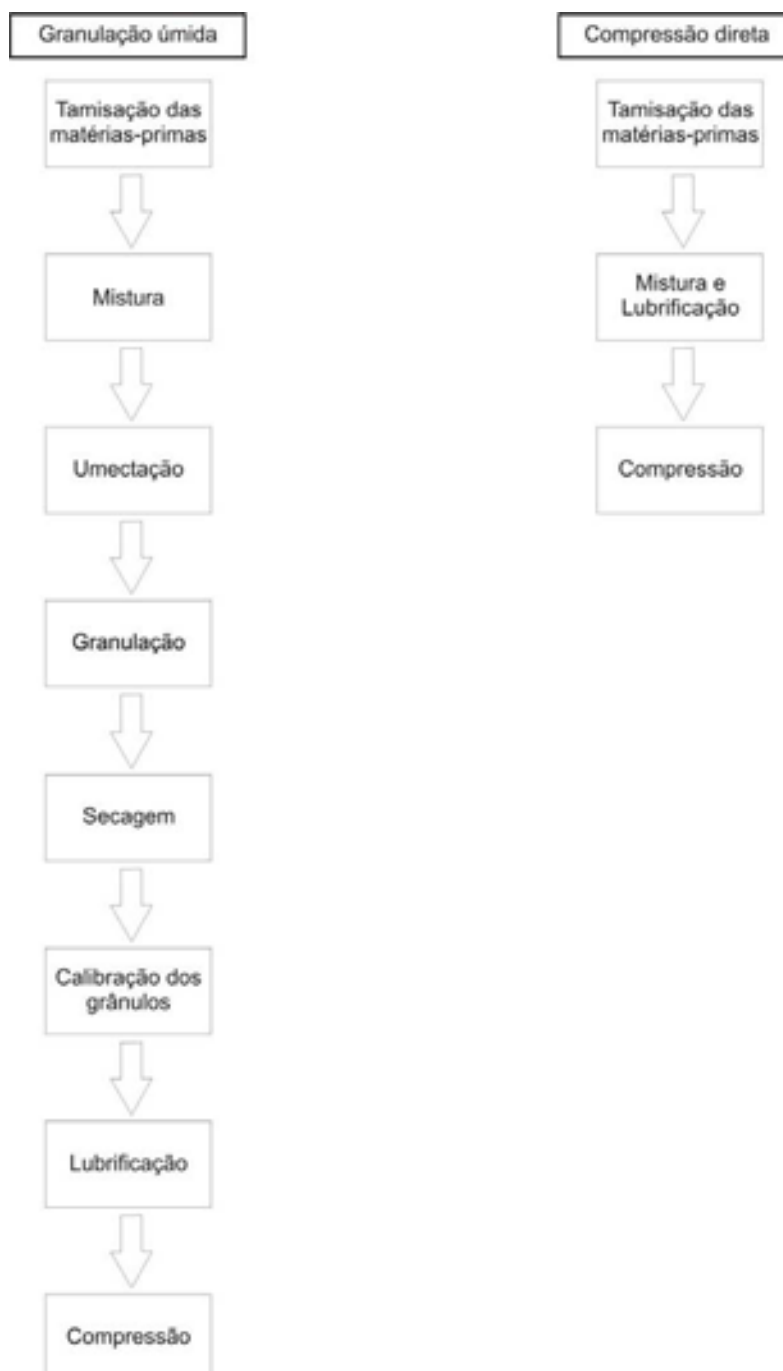


Figura 4. Esquema das etapas de granulação úmida e compressão direta.

Tabela 2. Componentes das formulações GU1 a GU5 e CD1.

Função	Matéria-prima	Formulações					
		GU1	GU2	GU3	GU4	GU5	CD1
Ativo	Extrato seco de soja	X	X	X	X	X	X
Diluyente	Lactose m-200	X	X	X	X	X	
	Fosfato dicálcio						X
	Amido de milho	X	X				
	Celulose microcristalina PH-102	X	X	X	X	X	X
Desintegrante	Croscarmelose sódica	X	X	X			X
	Polyplasdone XL-10				X		
	Polyplasdone XL					X	
Tensoativo	Lauril sulfato de sódio			X	X	X	
Aglutinante	Povidona	X	X	X	X	X	
Deslizante	Dióxido de silício	X	X	X	X	X	X
Lubrificante	Estearato de magnésio	X	X	X	X	X	X
Antioxidante	Metabissulfito de sódio	X					
	Butilhidroxitolueno		X	X	X	X	X
Filme de revestimento	Opadry® YS-1-7006	X	X	X	X	X	X
Plastificante	Polietilenoglicol 6.000	X	X	X	X	X	X
Opacificante	Dióxido de titânio	X	X	X	X	X	X
Deslizante	Talco	X	X	X	X	X	X
Corante	Corante óxido de ferro amarelo	X					
	Corante vermelho ponceau		X	X	X	X	X
	Corante amarelo tartrazina						X

Na granulação úmida todas as matérias-primas foram tamisadas em malha 1,0 mm. A isoflavona, diluentes e metade da quantidade dos desintegrantes foram misturados. A solução de umectação, preparada com o aglutinante em 90 mL de álcool, foi adicionada à mistura. A massa úmida formada foi passada pelo granulador cônico, utilizando malha 2,0mm, formando os grânulos. O granulado obtido foi recolhido em bandejas e colocado em estufa a 40°C, até que atingisse umidade abaixo de 5,0%. O granulado seco foi passado novamente pelo granulador cônico,

utilizando malha 1,4 mm. Após calibração o granulado foi colocado no misturador em V junto com o lubrificante (1,5%) e o deslizante (0,5%), e misturado por cinco minutos. Após a mistura final, o granulado foi colocado no funil da compressora e os comprimidos foram obtidos utilizando punção redondo de 9 mm bicôncavo, com peso médio teórico de 300 mg.

Na compressão direta todas as matérias-primas foram tamisadas em malha 1,4 mm, e colocadas no misturador em V por 10 minutos. A mistura foi colocada no funil da compressora e os comprimidos foram obtidos utilizando punção redondo de 9 mm bicôncavo.

Após a compressão as formulações foram revestidas em drageadora convencional para proteger da umidade, melhorar a aparência e mascarar o sabor do comprimido (HOGAN, 2005). A suspensão de revestimento foi preparada em álcool com o filme de revestimento, o plastificante, o opacificante, o deslizante e o(s) corante(s). Os comprimidos foram colocados na drageadora e submetidos a ar quente. Quando os comprimidos atingiram aproximadamente 40°C iniciou-se a aplicação dos 500 mL da suspensão.

#### 4.2.3.5 Testes físicos dos comprimidos

##### 4.2.3.5.1 *Determinação do Peso Médio*

Foram pesados individualmente 20 comprimidos em balança analítica. Em seguida, a média aritmética, desvio padrão e coeficiente porcentual de variação do peso foram determinados (BRASIL, 1988).

##### 4.2.3.5.2 *Determinação da Dureza*

A dureza de 20 comprimidos foi determinada em durômetro digital pela medida da resistência ao esmagamento radial. Foram calculados os coeficientes de variação, média e desvio padrão (BRASIL, 1988).

##### 4.2.3.5.3 *Espessura*

A espessura de 20 comprimidos foi determinada com o auxílio de paquímetro digital. Foram calculados os coeficientes de variação, média e desvio padrão (BRASIL, 1988).

#### 4.2.3.5.4 Determinação da Friabilidade

A friabilidade foi determinada com a pesagem de 20 comprimidos revestidos em balança analítica (peso inicial) de acordo com a Farmacopéia Brasileira 4ª. Edição. O teste foi feito em friabilômetro regulado a 20 rpm, durante 5 minutos. Após esse tempo, os 20 comprimidos foram pesados novamente (peso final) e foi determinada a friabilidade de acordo com a equação seguir (BRASIL, 1988).

$$\text{Friabilidade} = \frac{(P_i - P_f) * 100}{P_i} \quad (\text{Equação 3})$$

Na qual:

P<sub>i</sub> = peso inicial

P<sub>f</sub> = peso final

#### 4.2.3.5.5 Determinação do Tempo de Desintegração

O tempo de desintegração foi realizado de acordo com o método descrito na USP 30 (2007), que prevê a avaliação de seis comprimidos. Os comprimidos foram, então, colocados no aparelho de desintegração, empregando água como solvente, e o tempo necessário para desintegração dos comprimidos foi determinado em minutos com o auxílio de um cronômetro (USP 30, 2007).

#### 4.2.3.6 Determinação do teor dos comprimidos

Para a determinação do teor de daidzeína e genisteína, 20 comprimidos foram pesados e triturados. Em seguida o equivalente a um peso médio foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 100 mL, adicionado metanol e colocado em ultrassom por 20 minutos. Após o tempo no ultrassom o volume foi completado com metanol, a solução foi filtrada e uma alíquota de 100 µL foi colocada em vial com 900 µL de metanol. A quantificação foi feita por CLAE, conforme item 4.2.2.

### 4.2.4 Desenvolvimento da metodologia analítica para o método de dissolução

#### 4.2.4.1 Ensaio de solubilidade

A solubilidade dos marcadores daidzeína e genisteína foi determinada em diferentes meios com o intuito de avaliar o melhor meio para desenvolvimento da

dissolução. Os ensaios foram realizados em duplicata e os meios utilizados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Meios utilizados no ensaio de solubilidade.

Meios	Tensoativos		
	LSS	Tween <sup>®</sup> 80	Tween <sup>®</sup> 20
Água	-	-	-
	0,5%	-	-
	1,0%	-	-
	1,5%	-	-
	2,0%	-	-
	3,0%	-	-
	-	3,0%	-
	-	-	3,0%
Tampão Acetato de Sódio pH 4,5	-	-	-
	0,5%	-	-
HCl 0,1mol/L	-	-	-
	0,5%	-	-

Foram pesados 50mg do extrato e transferidos para um frasco de vidro âmbar. Em seguida, foram medidos 50mL de cada meio utilizado, aquecidos até atingir a temperatura de 37°C e adicionados nos respectivos frascos. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital na temperatura de 37°C e agitação de aproximadamente 150 rpm.

Na 1<sup>a</sup> e na 24<sup>a</sup> hora os frascos foram retirados da incubadora e coletadas alíquotas de 2mL de cada frasco. Após a coleta da 1<sup>a</sup> hora o volume retirado não foi repostado, e os frascos foram recolocados na incubadora rapidamente. As alíquotas coletadas foram colocadas em tubos falcon e centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em membrana de PVDF com 0,45 µm de porosidade, diluídos em metanol, diretamente em vials, utilizando-se os volumes 100µL de amostra e 900 µL de metanol. A quantificação das amostras foi realizada por CLAE.

#### 4.2.4.2 Ensaio de dissolução

Para determinar as condições ideais de dissolução utilizou-se planejamento fatorial fracionário 2<sup>4-1</sup> conforme Tabelas 4, 5 e 6, utilizando o melhor meio definido no ensaio de solubilidade.

Tabela 4 – Fatores do método de dissolução.

Fatores	Níveis	Nível (+)	Nível (-)
1	Meio de Dissolução	Água + 3,0% LSS	Água + 1,5% LSS
2	Aparato	Pá	Cesta
3	Velocidade de Rotação	100rpm	75rpm
4	Volume de meio	1000mL	900mL

Tabela 5 – Planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ .

Planejamento Fatorial para Ensaio de Dissolução				
Níveis	1	2	3	4
a	-	-	-	-
b	+	-	-	+
c	-	+	-	+
d	+	+	-	-
e	-	-	+	+
f	+	-	+	-
g	-	+	+	-
h	+	+	+	+

Tabela 6 – Condições avaliadas no planejamento fatorial

Ensaio	Condições
a	Água + 1,5% LSS/ Cesta/ 75rpm/ 900mL
b	Água + 3,0% LSS/ Cesta/ 75rpm/ 1000mL
c	Água + 1,5% LSS/ Pá/ 75rpm/ 1000mL
d	Água + 3,0% LSS/ Pá/ 75rpm/ 900mL
e	Água + 1,5% LSS/ Cesta/ 100rpm/ 1000mL
f	Água + 3,0% LSS/ Cesta/ 100rpm/ 900mL
g	Água + 1,5% LSS/ Pá/ 100rpm/ 900mL
h	Água + 3,0% LSS/ Pá/ 100rpm/ 1000mL

Todas as condições foram realizadas em triplicata na temperatura de 37°C. Foram coletadas amostras de 3 mL nos tempos de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 150 minutos. Sendo que após 120 minutos a rotação foi aumentada para 150rpm, para obter o ponto infinito, que pode fornecer dados de conteúdo uniformidade e informações úteis sobre a formulação e características durante o desenvolvimento inicial ou sobre o viés do método (USP 30, 2007). Garantindo manutenção da condição sink do ensaio, optou-se pela não reposição do meio de dissolução após as coletas.

As amostras coletadas foram filtradas em membrana de PVDF com 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade, diluídas em metanol, diretamente em vials, utilizando-se os volumes 800 $\mu\text{L}$  de amostra e 200  $\mu\text{L}$  de metanol. A quantificação das amostras foi realizada por CLAE conforme descrito no item 4.2.2.

Para a caracterização de formulações, testes de dissolução devem ser executados em diferentes condições de teste até que a dissolução exceda 80% da quantidade declarada (FIP, 1996).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os resultados das contagens das unidades formadoras de colônia foram apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados da contagem de bactérias, fungos e leveduras.

Grupos		Contagem de Bactérias			Contagem de Fungos e Leveduras		
		Placa 1	Placa 2	Média	Placa 1	Placa 2	Média
1º Grupo (Extrato + Inóculo)	<i>E. coli</i>	23	27	25	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	36	55	45,5	-	-	-
	<i>C. albicans</i>	-	-	-	300	300	300
	<i>A. Niger</i>	-	-	-	35	37	36
2º Grupo (Diluyente + Inóculo)	<i>E. coli</i>	16	17	16,5	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	41	47	44	-	-	-
	<i>C. albicans</i>	-	-	-	298	300	299
	<i>A. niger</i>	-	-	-	33	26	29,5
3º Grupo (Controle Positivo)	<i>E. coli</i>	20	22	21	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	30	40	35	-	-	-
	<i>C. albicans</i>	-	-	-	249	300	274,5
	<i>A. niger</i>	-	-	-	32	37	34,5
Padronização do inóculo	<i>E. coli</i>	22	24	23	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	30	28	29	-	-	-
	<i>C. albicans</i>	-	-	-	242	260	251
	<i>A. niger</i>	-	-	-	38	44	41
4º Grupo (Controle Negativo)		0 UFC			0 UFC		
5º Grupo (Extrato)		0 UFC			0 UFC		

No 1º grupo, *E. coli* apresentou crescimento de 119,0% em relação ao observado no controle positivo (grupo 3). *S. aureus* apresentou crescimento de 130,0% em relação ao observado no controle positivo (grupo 3). *C. albicans* apresentou crescimento de 109,3% em relação ao observado no controle positivo (grupo 3). *A. niger* apresentou crescimento de 104,3% em relação ao observado no controle positivo (grupo 3). Demonstrando que o extrato não inativa os inóculos

utilizados, pois permite que eles cresçam na sua presença. Esse parâmetro é importante pois se o extrato inativar o crescimento das bactérias e fungos o resultado da análise microbiológica será alterado.

No 2º grupo, *E. coli* apresentou crescimento de 78,6% em relação ao observado no controle positivo (grupo 3). *S. aureus* apresentou crescimento de 125,7% em relação ao observado no controle positivo (grupo 3). *C. albicans* apresentou crescimento de 108,9% em relação ao observado no controle positivo (grupo 3). *A. niger* apresentou crescimento de 85,5% em relação ao observado no controle positivo (grupo 3). Demonstrando que o diluente utilizado não impede o crescimento das bactérias e fungos.

No 3º grupo, *E. coli* apresentou crescimento de 91,3% em relação ao observado no controle positivo (grupo 3). *S. aureus* apresentou crescimento de 120,7% em relação ao observado no controle positivo (grupo 3). *C. albicans* apresentou crescimento de 109,4% em relação ao observado no controle positivo (grupo 3). *A. niger* apresentou crescimento de 84,1% em relação ao observado no controle positivo (grupo 3). Por ser o grupo de controle positivo as bactérias e fungos cresceram adequadamente, não mostrando nenhuma alteração em relação aos inóculos.

Os grupos 4 e 5 não apresentaram crescimento. O grupo 4 mostrou que os meios e materiais utilizados não estavam contaminados, sendo o controle negativo. E os resultados observados com o grupo 5 evidenciaram que o extrato não estava contaminado, portanto adequado para ser utilizado no desenvolvimento das formulações objeto deste estudo.

A análise microbiológica em matéria-prima vegetal é primordial, sendo preconizada pela resolução RDC 48 (2004), pois a contaminação por microorganismos pode trazer diversos prejuízos à saúde do consumidor. Portanto apenas matérias-primas que não contenham contaminação microbiológica devem ser utilizadas na produção de medicamentos.

## 5.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA DETERMINAÇÃO DE GENISTEÍNA E DAIDZEÍNA.

Para padronizar o método cromatográfico diferentes condições analíticas foram utilizadas conforme demonstrado no item 4.2.2.1. As diferentes condições foram avaliadas quanto ao pH, tempo de retenção, resolução e simetria dos picos para os analitos. Obteve-se como resultado número de pratos teóricos acima de 8000 para todas as análises, fator de simetria, segundo USP 30 (2007) de 1,15 e 1,12 para a genisteína e daidzeína respectivamente. Segundo Ribani e colaboradores (2004) o número mínimo de pratos teóricos para validação de métodos por CLAE dever ser de 2000.

A especificidade e seletividade do método foram determinadas através de análise comparativa entre os cromatogramas obtidos a partir da solução padrão dos analitos, analisados separadamente e quando combinados na mesma solução. A análise dos cromatogramas demonstrou a inexistência de qualquer interferente, inclusive dos solventes e excipientes conforme demonstrado pela Figura 5 além de demonstrar boa resolução do cromatograma, com completa separação dos picos (Figura 6). Os tempos de retenção para a genisteína e daidzeína foram de 3,72 e 3,13 respectivamente.

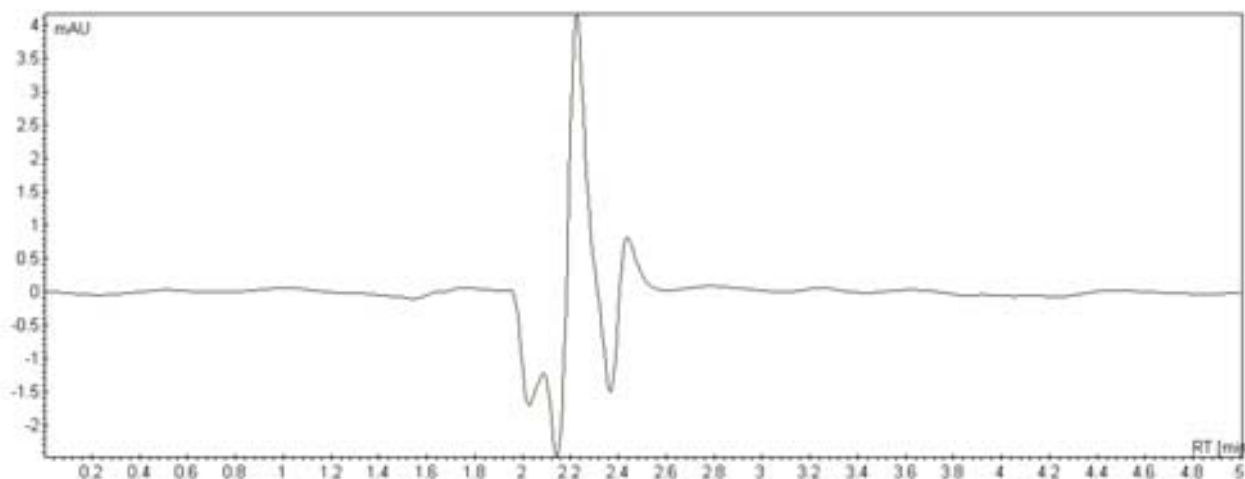


Figura 5. Cromatograma do placebo. Coluna de fase reversa C18 150 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m, UV 254 nm, fase móvel: metanol com 0,1% de ácido acético, água com 0,1% de ácido acético e acetonitrila na proporção 64:32:4, fluxo de 0,7 mL/min, temperatura de 30°C, e volume de injeção de 10  $\mu$ L.

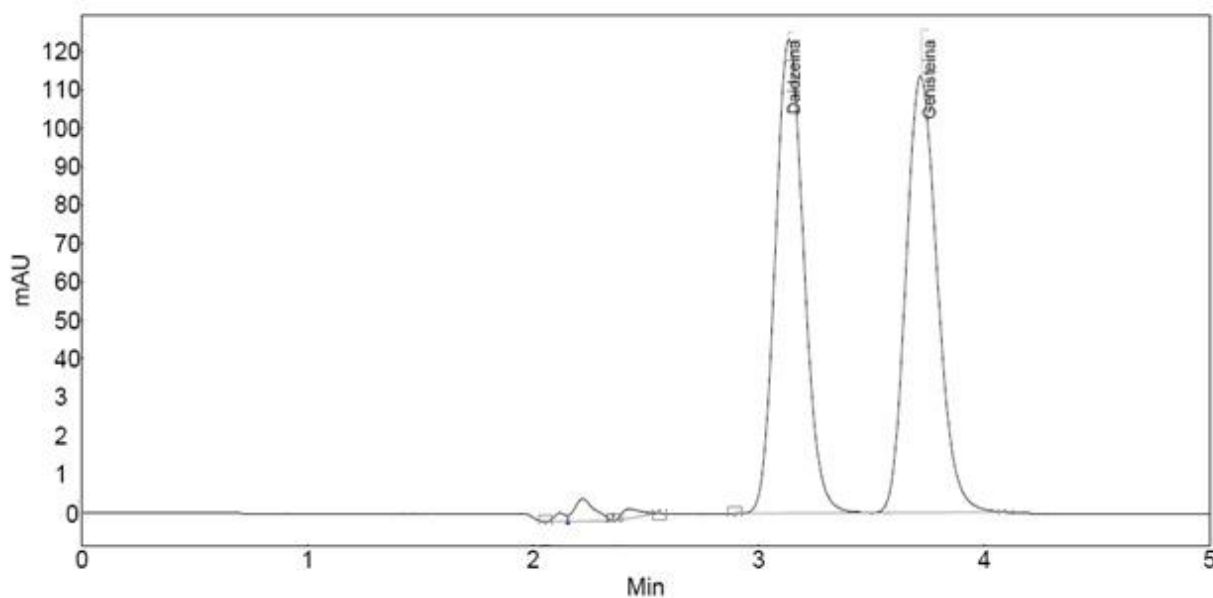


Figura 6. Cromatograma padrão de daidzeína e genisteína. Coluna de fase reversa C18 150 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m, UV 254 nm, fase móvel: metanol com 0,1% de ácido acético, água com 0,1% de ácido acético e acetonitrila na proporção 64:32:4, fluxo de 0,7 mL/min, temperatura de 30°C, e volume de injeção de 10  $\mu$ L.

Das condições cromatográficas avaliadas a que apresentou melhor simetria dos picos, menor tempo de retenção foi a que utilizou método isocrático, com fase móvel constituída por metanol e água ambos acidificados com 0,1% de ácido acético, e acetonitrila na proporção 64:32:4, fluxo de 0,7 mL/min, temperatura de 30°C, e volume de injeção de 10 µL.

A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação ( $R^2$ ), obtido a partir da média das 3 curvas de calibração, conforme ilustrado nas Figuras 7 e 8. A linearidade do método demonstrou proporcionalidade entre as diferentes concentrações de padrão, as absorvâncias e as áreas dos picos. O coeficiente de correlação com valores acima de 0,99 demonstra que as soluções apresentaram boa correlação linear entre a absorvância e as concentrações, indicando que os coeficientes de linearidade são adequados. Esta correlação foi verificada na faixa de concentração de 1,5 µg/mL a 36,0 µg/mL, tendo sido utilizados nove valores para a construção da curva conforme descrito na Tabela 9 para daidzeína e genisteína.

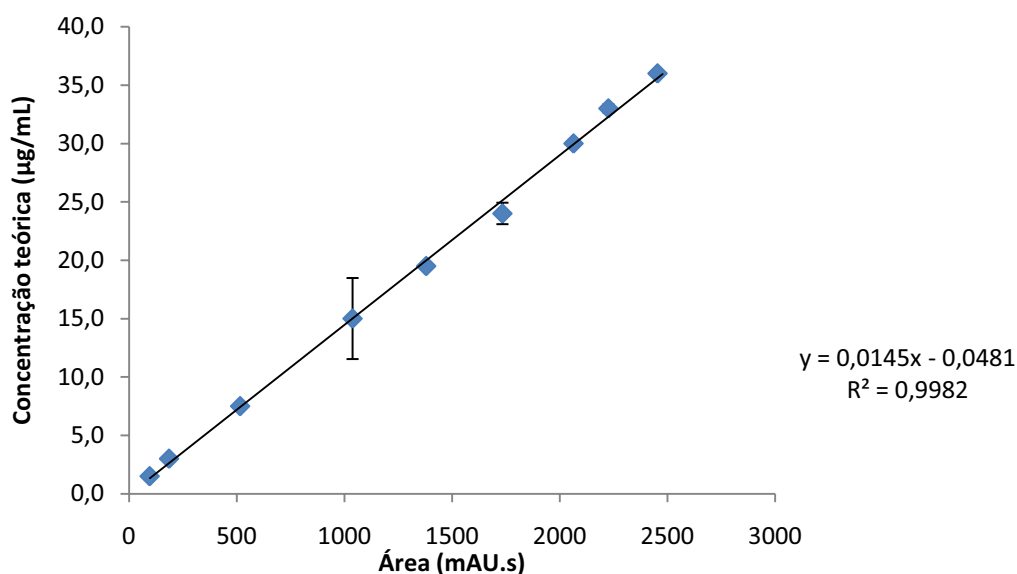


Figura 7. Curva de calibração da daidzeína (média de 3 determinações).

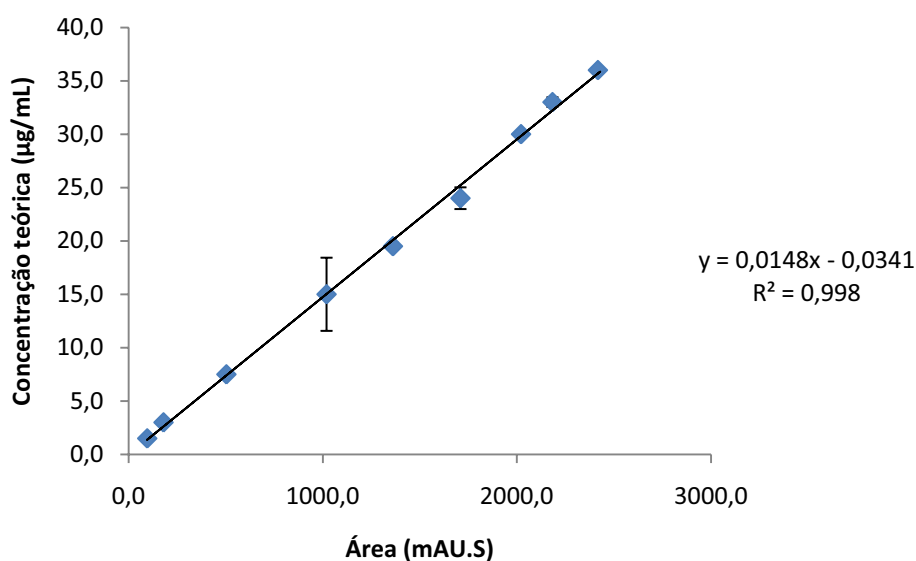


Figura 8. Curva de calibração da genisteína (média de 3 determinações).

Segundo a Resolução – RE nº 899 (2003), coeficientes de correlação da curva próximos a 1 significam que o método apresenta linearidade. Assim, a metodologia analítica desenvolvida demonstrou linearidade uma vez que apresentou resultados diretamente proporcionais às concentrações de daidzeína e genisteína presentes nas soluções com coeficiente de correlação igual a 0,9982 e 0,998 respectivamente. As equações da reta obtidas foram iguais a  $y = 2060,8x + 5,5963$  e  $y = 2026,9x + 4,9076$  para a daidzeína e genisteína respectivamente.

### 5.2.1 Verificação da precisão e exatidão.

Os valores obtidos dos ensaios de precisão, precisão intermediária, repetibilidade e exatidão durante período de validação foram demonstrados nas Tabelas 8, 9, 10 e 11. Todos os valores estão de acordo com os limites recomendados pela Resolução – RE nº 899 (2003), que prevê que a precisão pode ser expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas não se admitindo valores superiores a 5% e que a exatidão esteja entre 95 a 105%.

#### 5.2.1.1 Daidzeína

O método cromatográfico também demonstrou precisão e exatidão para a daidzeína dentro dos limites aceitáveis para os níveis analisados conforme demonstrado nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Precisão e Exatidão obtidas para a daidzeína obtidas utilizando método cromatográfico descrito no item 5.2.

Concentração Teórica (µg/mL)	Área do pico (mAU.min)		Média	DP	DPR	Concentração calculada (µg/mL)		Média	DP	DPR	Exatidão (%)
1,5	1,20	1,20	1,23	0,06	4,68	1,54	1,57	1,54	0,03	1,87	102,44
	17,2	17,2	17,20	0,00	0,00	14,59	14,57	14,603	0,034	0,233	97,4
30	36,2	35,8	35,97	0,21	0,58	30,12	29,93	29,953	0,128	0,426	99,8

Tabela 9. Precisão Intermediária e Exatidão obtidas para a daidzeína utilizando método cromatográfico descrito no item 5.2.

Concentração Teórica (µg/mL)	Área do pico (mAU.min)			Média	DP	DPR	Concentração calculada (µg/mL)			Média	DP	DPR	Exatidão (%)
1,5	1,6	1,6	1,6	1,60	0,00	0,00	1,49	1,53	1,50	1,51	0,02	1,13	100,44
	16,3	16,5	16,9	16,57	0,31	1,84	14,37	14,51	14,88	14,59	0,22	1,47	97,24
30	33,5	33,4	33	33,30	0,26	0,79	29,38	29,33	28,95	29,22	0,19	0,66	97,40

### 5.2.1.2 Genisteína

O método cromatográfico demonstrou precisão e exatidão para a genisteína dentro dos limites aceitáveis para os níveis analisados conforme demonstrado nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Precisão e exatidão obtidas para a genisteína utilizando método cromatográfico descrito no item 5.2.

Concentração Teórica (µg/mL)	Área do pico (mAU.min)			Média	DP	DPR	Concentração calculada (µg/mL)			Média	DP	DPR	Exatidão (%)
	1,1	1,1	1,1				1,49	1,47	1,49				
1,5	1,1	1,1	1,1	1,1	0	0	1,49	1,47	1,49	1,48	0,01	0,64	98,89
15	16,4	16,40	16,40	16,40	0,00	0,00	14,44	14,48	14,46	14,46	0,02	0,11	96,40
30	34,3	34,10	34,10	34,17	0,12	0,34	29,71	29,51	29,51	29,58	0,09	0,32	98,59

Tabela 11. Precisão intermediária e exatidão obtidas para a genisteína utilizando método cromatográfico descrito no item 5.2.

Concentração Teórica (µg/mL)	Área do pico (mAU.min)			Média	DP	DPR	Concentração calculada (µg/mL)			Média	DP	DPR	Exatidão (%)
	1,60	1,60	1,60				1,46	1,52	1,50				
1,5	1,60	1,60	1,60	1,60	0,00	0,00	1,46	1,52	1,50	1,49	0,02	1,67	99,56
15	16,10	16,20	16,50	16,27	0,21	1,28	14,36	14,51	14,81	14,56	0,19	1,28	97,07
30	33,00	32,70	32,30	32,67	0,35	1,08	29,47	29,16	28,89	29,17	0,24	0,81	97,24

### 5.2.3 Verificação dos limites de quantificação e detecção para daidzeína e genisteína

O limite de quantificação foi estabelecido por meio da análise de concentrações decrescentes dos marcadores até o menor nível quantificável e detectável com precisão e exatidão aceitáveis. O limite de quantificação deve ser no mínimo cinco vezes superior a qualquer interferente da amostra branco no tempo de retenção do fármaco e o pico de resposta do fármaco deve ser identificável e reproduzível com desvio de precisão até 5% e exatidão de 95 a 105% (BRASIL, 2003).

O limite de detecção também foi estabelecido por meio da análise de concentrações decrescentes do fármaco, até menor nível detectável correspondente a 3 vezes o ruído da linha de base.

#### 5.2.3.1 Limites de Quantificação e Detecção para a daidzeína e genisteína

A menor concentração dos analitos, determinadas quantitativamente, cujo pico de resposta foi reproduzível e identificável com precisão demonstrado por DPR menor ou igual 5% e exatidão entre 95 - 105%, para daidzeína e genisteína foi de 80ng/mL (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12. Limite de quantificação e detecção obtidos para daidzeína utilizando método cromatográfico descrito no item 5.2.

Concentração Teórica (µg/mL)	Média (µg/mL) n=6	DP	DPR	EXATIDÃO (%)
0,07	0,07	0,02	20,00	107,14
<b>0,08 (LQ e LD)</b>	0,08	0,00	4,92	104,9

Tabela 13. Limite de quantificação e detecção obtidos para genisteína utilizando método cromatográfico descrito no item 5.2.

Concentração Teórica (µg/mL)	Média (µg/mL) n=6	DP	DPR	EXATIDÃO (%)
0,07	0,06	0,00	7,69	92,86
<b>0,08 (LQ e LD)</b>	0,08	0,00	4,63	104,8

### 5.3 ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO

#### 5.3.1 Análise térmica

A Figura 9 apresenta as curvas obtidas no DSC do extrato utilizado na manipulação dos comprimidos, sobreposta com as curvas dos padrões daidzeína e genisteína. Observa-se que o ponto de fusão da daidzeína ocorre em 335,5°C e que o ponto de fusão da genisteína ocorre em 303°C (Figura 9).

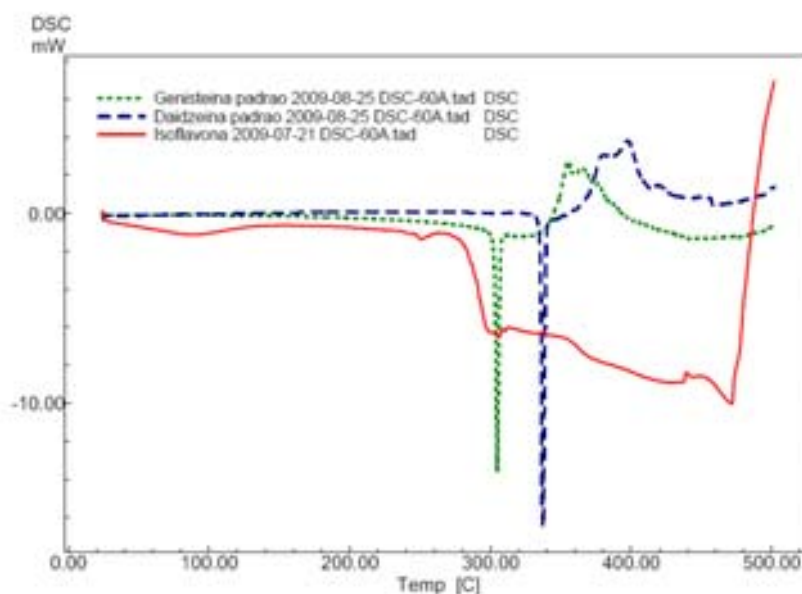


Figura 9. Curvas de DSC do extrato seco de soja, padrões daidzeína e genisteína. Velocidade de aquecimento de 10°C/min, faixa de aquecimento entre 25°C e 500°C, fluxo do gás de purga, nitrogênio, sob fluxo de 50mL/min.

A sobreposição das curvas dos padrões de daidzeína e genisteína à curva da matéria-prima demonstra que os referidos picos de fusão dos padrões não se repetem na curva DSC do extrato, pelo menos não de forma evidente. Possivelmente pela baixa proporção desses marcadores no extrato em comparação com os padrões analisados. Além disso, a presença de impurezas no extrato favorece o aparecimento de picos irregulares na curva de DSC, visto que extrato vegetal possui vários constituintes (Figura 9).

A Figura 10 mostra as curvas obtidas no DSC e no TG do extrato utilizado na manipulação dos comprimidos. Nas curvas não foi possível observar eventos bem definidos, característicos de fusão, provavelmente por se tratar de análise do extrato seco, que contém mistura de diferentes componentes e devido à proporção em massa, já discutido anteriormente. Na curva DSC próximo à temperatura de 100°C é possível observar uma endoterma, que coincide com a perda de massa de 3,3% na mesma região na curva TG. Sendo essa perda referente à água (umidade do extrato), visto que quando realizada a análise de umidade residual por balança de infravermelho (item 5.3.3.1) foi verificado uma umidade de 4,4%. Acredita-se que esta diferença encontrada nas duas análises se dê devido ao fato de que a análise de perda de água através das curvas de TG seja mais precisa do que aquela realizada por umidade residual em balança. Entretanto, foi possível verificar a perda de água existente na amostra. A degradação do extrato inicia em 200°C, sendo que, entre 200 e 300°C a massa do extrato diminui quase 17% (Figura 10).

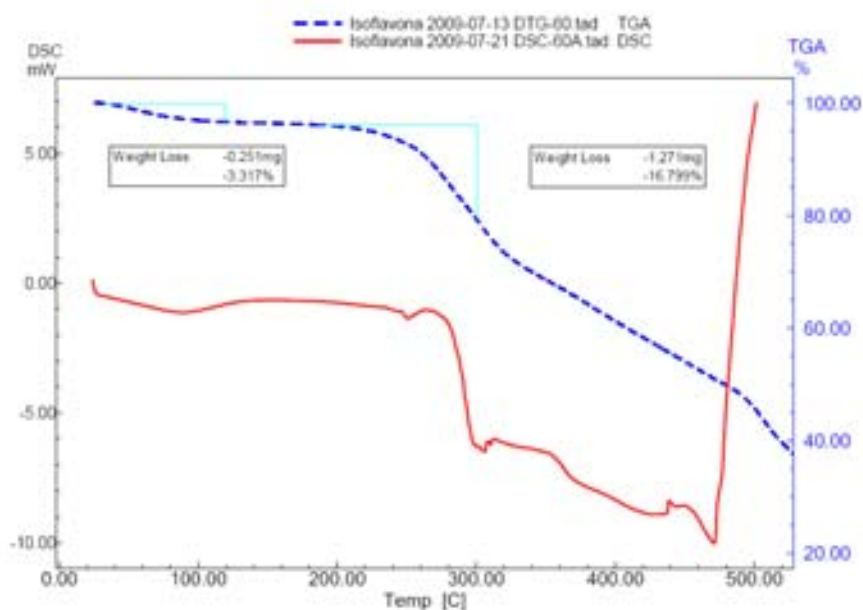


Figura 10. Curvas de DSC e TG do extrato seco de soja. Velocidade de aquecimento de 10°C/min, faixa de aquecimento entre 25°C e 500°C, fluxo do gás de purga, nitrogênio, sob fluxo de 50mL/min.

Através de análises em DSC da mistura física na proporção de 1:1 entre o fármaco e os excipientes de interesse, é possível estimar a compatibilidade entre os componentes da formulação para que as possíveis interações fiquem mais evidenciadas (MURA et al., 1998). Assim, para analisar a compatibilidade entre os excipientes utilizados nas formulações (Tabela 1) e a isoflavona foram avaliadas as sobreposições das curvas extrato, excipiente isolado e mistura binária. Isso foi possível através da sobreposição das curvas DSC do excipiente isolado e em mistura com o extrato.

Dessa forma, estão relacionadas a seguir algumas das curvas das misturas do extrato com excipientes de interesse. Conforme indicado na legenda de cada figura, o tracejado pequeno corresponde à curva do excipiente, o tracejado maior corresponde ao extrato seco de soja (isoflavona), e a linha contínua se refere à mistura física de ambos. Como nas curvas DSC das misturas à proporção de excipiente equivale a 50%, espera-se que a intensidade do seu pico de fusão seja reduzida pela metade.

A Figura 11 apresenta a curva DSC da mistura da isoflavona com o amido de milho. Como é possível perceber, existe uma endoterma de fusão próxima dos 100°C nas curvas do excipiente e da mistura física, indicando perda de água. Não havendo indício de interação entre o extrato e o amido de milho.

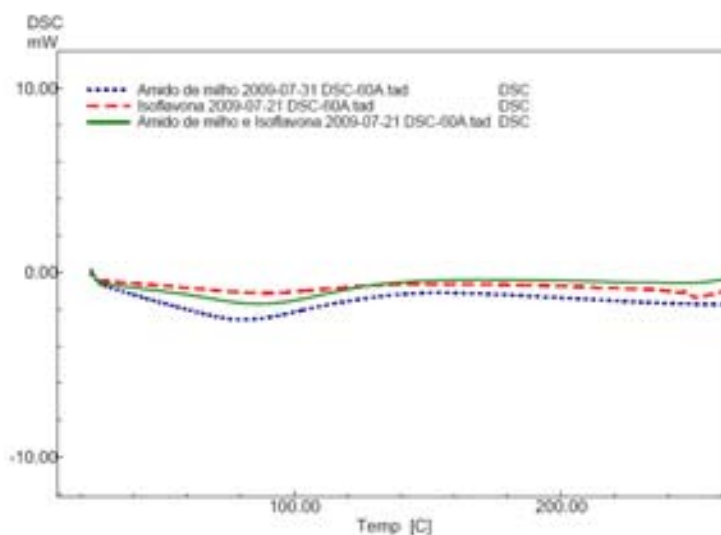


Figura 11. Curvas DSC do extrato, amido de milho e mistura binária. Velocidade de aquecimento de 10°C/min, faixa de aquecimento entre 25°C e 500°C, fluxo do gás de purga, nitrogênio, sob fluxo de 50mL/min.

Através da análise da Figura 12 pode-se sugerir ausência de interação entre a isoflavona e o dióxido de silício, uma vez que a curva DSC da mistura física, em linha contínua, não apresenta nenhum evento térmico detectado nas curvas do fármaco ou do excipiente sozinhos.

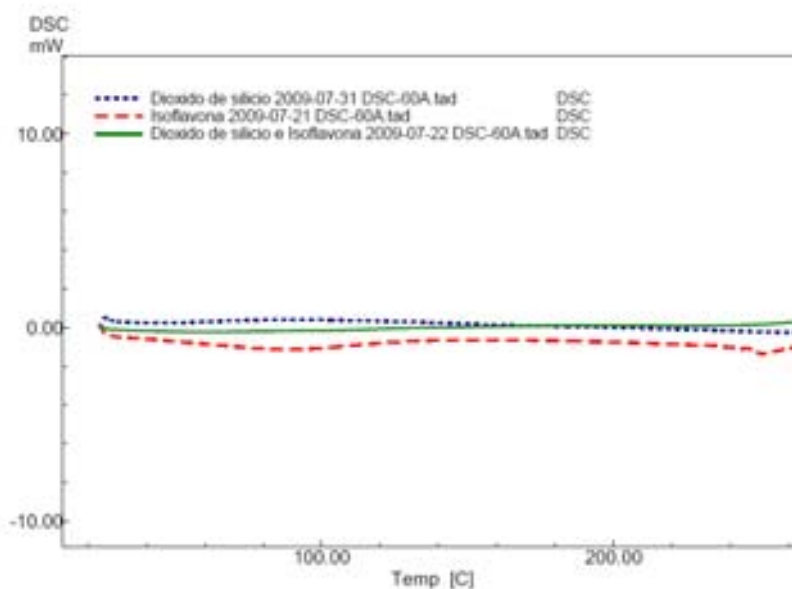


Figura 12. Curvas DSC do extrato, dióxido de silício sozinho e mistura binária. Velocidade de aquecimento de 10°C/min, faixa de aquecimento entre 25°C e 500°C, fluxo do gás de purga, nitrogênio, sob fluxo de 50mL/min.

O estearato de magnésio apresenta duas moléculas de água de hidratação (aproximadamente 5.5% do seu peso). O processo de desidratação ocorre a partir dos 70°C. Além disso, há um pico de fusão em torno de 120°C, que às vezes aparece em temperaturas menores ou mesmo se sobrepõe aos eventos de desidratação (CUNHA-FILHO et al., 2007). Eventos endotérmicos discretos mostram essa característica de desidratação do estearato de magnésio na Figura 13.

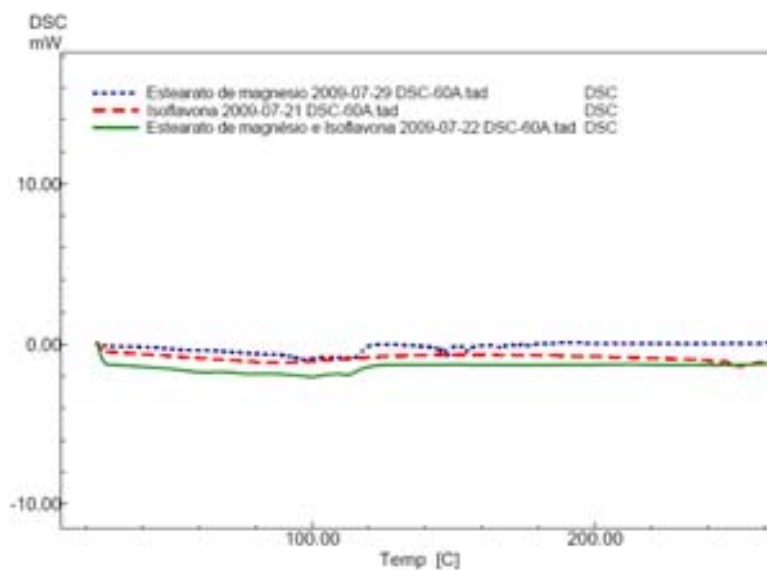


Figura 13. Curvas DSC do extrato, estearato de magnésio e mistura binária. Velocidade de aquecimento de 10°C/min, faixa de aquecimento entre 25°C e 500°C, fluxo do gás de purga, nitrogênio, sob fluxo de 50mL/min.

O perfil DSC do fosfato dicálcico dihidratado (Figura 14) é associado à perda de água de hidratação desse material e à formação de fosfato dicálcico anidro. O processo de desidratação ocorre em duas etapas em 150,8°C e 191,1°C segundo Cunha-Filho e colaboradores (2007). Observando a curva DSC do excipiente fosfato dicálcico dihidratado e da sua mistura física com a isoflavona, esse comportamento se repete. Ou seja, não existe evidência de interação da isoflavona com esse excipiente.

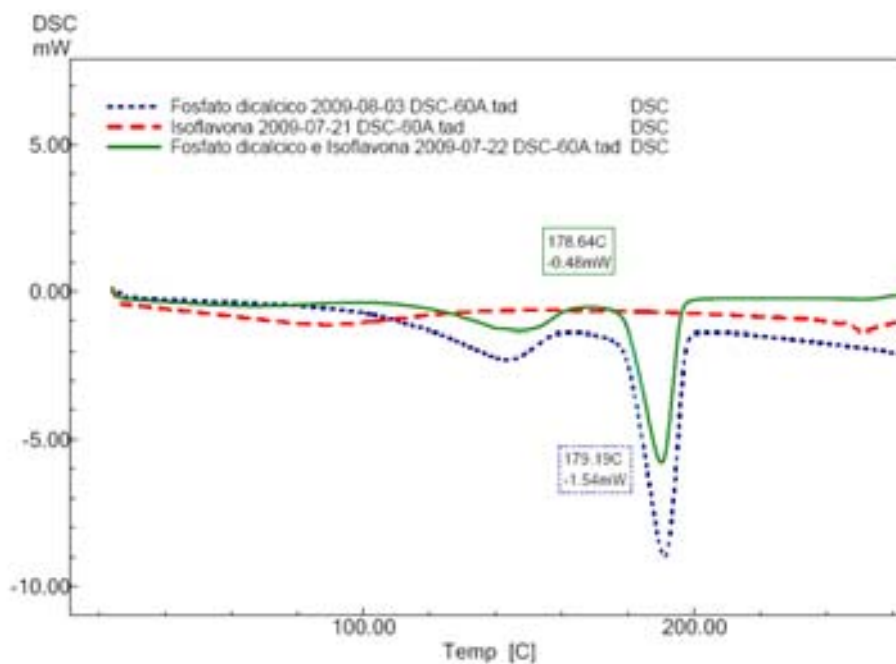


Figura 14. Curvas DSC do extrato, fosfato dicálcico dihidratado e mistura binária. Velocidade de aquecimento de 10°C/min, faixa de aquecimento entre 25°C e 500°C, fluxo do gás de purga, nitrogênio, sob fluxo de 50mL/min.

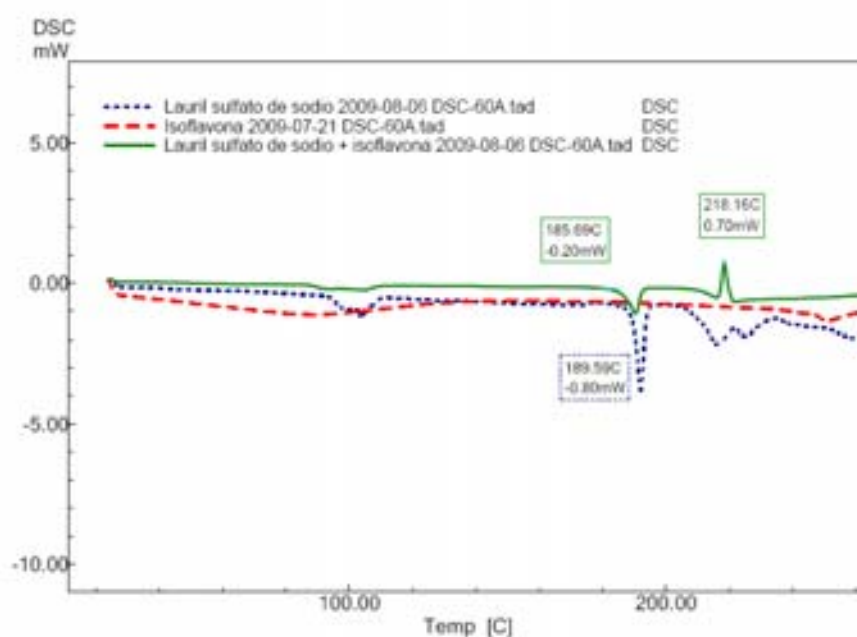


Figura 15. Curvas DSC do extrato, lauril sulfato de sódio e mistura binária. Velocidade de aquecimento de 10°C/min, faixa de aquecimento entre 25°C e 500°C, fluxo do gás de purga, nitrogênio, sob fluxo de 50mL/min.

O lauril sulfato de sódio (Figura 15) apresenta um pico endotérmico, possivelmente de fusão, um pouco antes de 190°C. Esse pico também aparece na curva DSC da mistura física, apesar de estar um pouco deslocado e diminuído. O pico exotérmico detectado em 218°C não foi observado tanto na curva DSC desse excipiente quanto na curva DSC do extrato, e pode ser indicativo de interação entre o lauril e o extrato.

Por isso foi feita a análise em TG do excipiente lauril sulfato de sódio (Figura 16) para verificar o seu perfil de degradação de massa, e a possível interação com o extrato.

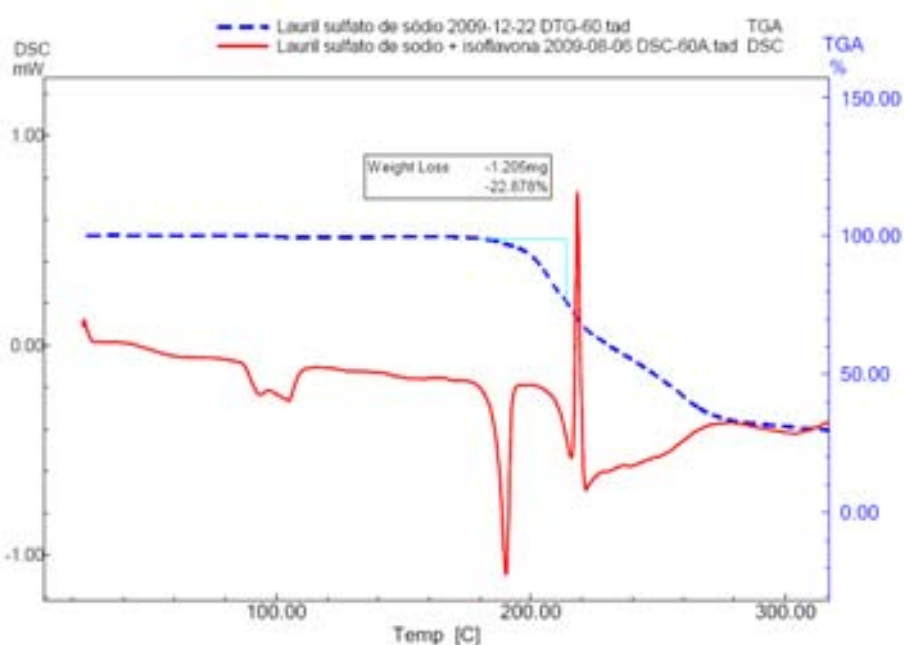


Figura 16. Curva DSC da mistura binária extrato e lauril sulfato de sódio e curva TG do lauril sulfato de sódio. Velocidade de aquecimento de 10°C/min, faixa de aquecimento entre 25°C e 500°C, fluxo do gás de purga, nitrogênio, sob fluxo de 50mL/min.

A Figura 16 mostra que antes desse evento exotérmico verificado na curva DSC da mistura binária o lauril sulfato de sódio já havia perdido 22,9% de sua massa inicial. Ou seja, a partir desse ponto o excipiente já iniciou sua degradação, não sendo possível avaliar uma possível interação visto que a característica do excipiente já está alterada.

### 5.3.2 Teor de daidzeína e genisteína no extrato seco de soja

O teor de daidzeína e genisteína encontrado no extrato pelas duas formas analisadas foi apresentado na Tabela 14 em porcentagem de cada marcador.

Tabela 14. Teor de daidzeína e genisteína no extrato seco de soja.

	Não hidrolisada (n=3)	Hidrolisada (n=3)
Daidzeína	27,8% ± 1,2	27,5% ± 0,2
Genisteína	11,1% ± 0,7	11,0% ± 0,1

A hidrólise ácida das isoflavonas promove a conversão de glicosídeos em agliconas através da retirada do açúcar por meio de aquecimento da amostra em meio ácido (CÉSAR et al., 2006; CAMPOS et al., 2007; ROSTAGNO et al., 2009). Segundo Rostagno e colaboradores (2009) a vantagem da hidrólise ácida é simplificar a análise, reduzindo o número de derivados, o tempo de corrida, e a possibilidade do uso de método isocrático quando analisado por CLAE. Campos e colaboradores (2007) relatam que a análise das formas agliconas totais, principalmente daidzeína e genisteína, é fundamental por serem as principais formas relacionadas à terapêutica, e pelo fato dos glicosídeos sofrerem hidrólise no organismo para depois serem absorvidos na forma de aglicona. Portanto a quantificação de agliconas é muito importante, visto que a quantidade de isoflavonas é muito variável nos extratos e comprimidos.

César e colaboradores (2006) avaliaram a eficiência da hidrólise pelo aumento nas concentrações de aglicona, com conseqüente redução da área dos picos referentes aos glicosídeos. E relataram que a melhor condição de hidrólise testada foi a que utilizou ácido clorídrico etanólico 3 mol/L, em banho-maria fervente, por 40 minutos (César et al., 2006).

Segundo Genovese e Lajolo (2001), para que haja hidrólise total das isoflavonas é necessário um refluxo de pelo menos 2 horas com HCl 2 mol/L em banho de água fervente, porém em tais condições as isoflavonas sofrem

degradação, concluindo-se que a determinação de isoflavonas na forma originalmente presente, sem hidrólise, é mais adequada. Rostagno, Palma e Barroso (2005) relatam que acima de 40°C as isoflavonas começam a sofrer degradação, principalmente a daidzeína.

A hidrólise foi realizada conforme descrito por César e colaboradores (2006) como a melhor condição para a hidrólise. Porém, como demonstrado na Tabela 14, o teor dos marcadores não teve alteração significativa entre os dois métodos analisados. Este fato pode ser explicado pela possível degradação de isoflavonas, ou por conter uma quantidade muito pequena de glicosídeos. Segundo laudo do fabricante do extrato utilizado, os glicosídeos representam cerca de 1%.

Como houve pequena diferença entre os métodos avaliados, o método direto (sem hidrólise) foi escolhido como forma de análise, por apresentar menores custos e menor tempo de análise.

Levando-se em consideração a análise do teor do extrato pelo método direto foram encontrados 27,8% e 11,1% de daidzeína e genisteína, respectivamente. Portanto estas foram as porcentagens utilizadas em todos os cálculos que envolveram a utilização do extrato ao longo do desenvolvimento do trabalho para caracterizar a quantidade de cada marcador.

### **5.3.3 Formulações de comprimidos**

#### **5.3.3.1 Análise dos pós e granulados**

O extrato seco de soja, a mistura de pós da formulação CD1 (compressão direta) e os granulados das formulações GU1, GU2, GU3, GU4 e GU5 foram analisados quanto à velocidade de escoamento, ao ângulo de repouso, à compressibilidade, ao índice de Hausner e à umidade residual conforme demonstrado na Tabela 15.

Tabela 15. Resultados das análises dos pós e granulados.

	Velocidade de escoamento (100g)	Ângulo de repouso	Compressibilidade	Índice de Hausner	Umidade residual (%)
Extrato seco de soja	Não apresentou fluxo	-	42,86	1,75	4,4 ± 0,2
Formulação GU1	6,0 s ± 1,0s	30,0° ± 1,3°	25,37	1,34	3,7 ± 0,1
Formulação GU2	6,7 s ± 0,9s	34,1° ± 1,8°	26,06	1,35	2,7 ± 0,2
Formulação GU3	4,8 s ± 0,8s	28,4° ± 0,5°	18,68	1,23	4,6 ± 0,1
Formulação GU4	4,8 s ± 1,1s	28,3° ± 1,2°	22,45	1,29	5,0 ± 0,1
Formulação GU5	4,5 s ± 0,5s	27,6° ± 0,9°	16,85	1,20	4,9 ± 0,2
Formulação CD1	50,6 s ± 2,8s	39,2° ± 1,1°	40,00	1,66	2,3 ± 0,3

Valores de referência: Ângulo de repouso 25 a 30° – fluxo excelente, 31 a 35° – fluxo bom, 36 a 40° – fluxo razoável, 41 a 45° – fluxo tolerável, 46 a 55° – fluxo pobre, 56 a 65° – fluxo muito pobre, > 66° – fluxo muito, muito pobre (USP 30, 2007). Compressibilidade de 5 a 15 – fluxo excelente, 12 a 16 – fluxo bom, 18 a 21 – fluxo favorável, 23 a 35 – fluxo fraco, 33 a 38 – fluxo muito fraco, > 40 – fluxo extremamente fraco (USP 30, 2007). Índice de Hausner 1,00 a 1,11 – fluxo excelente, 1,12 a 1,18 – fluxo bom, 1,19 a 1,25 – fluxo razoável, 1,26 a 1,34 – fluxo tolerável, 1,45 a 1,45 – fluxo pobre, 1,46 a 1,59 – fluxo muito pobre, > 1,60 – fluxo muito, muito pobre (USP 30, 2007).

Segundo Emshanova (2008), para que o método de compressão direta possa ser utilizado, o fármaco deve apresentar boas propriedades de fluxo. Portanto, de acordo com os resultados observados na Tabela 15 foi possível verificar que o método de compressão direta não foi adequado para a isoflavona, visto que ela não

apresentou fluxo contínuo. O resultado foi confirmado através da análise da formulação CD1, pois apresentou um tempo de escoamento muito superior ao apresentado pelas formulações obtidas por via úmida, além de um maior ângulo de repouso, altos índices de compressibilidade e de Hausner (WELLS, 2005).

As formulações obtidas por via úmida apresentaram melhor fluxo. O resultado já era esperado, visto que tal processo promove a melhora do fluxo (EMSHANOVA, 2008). A formulação GU2 proporcionou a formação de um ângulo de 34,1°, que segundo a USP 30 (2007), corresponde a uma boa capacidade de fluxo. Enquanto as formulações GU1, GU3, GU4 e GU5 proporcionaram a formação de ângulos situados entre 25 e 30°, correspondendo a um fluxo excelente. Após a análise de todas as formulações foi verificado que a formulação GU5 apresentou as melhores propriedades de fluxo, pois resultou na melhor velocidade de escoamento, ângulo de repouso, compressibilidade e índice de Hausner.

De acordo com Wu e colaboradores (2007), a granulometria pode ser avaliada através da utilização de jogos de tamises colocados em seqüência, contendo tamanhos de malhas variados e em ordem decrescente de tamanho. Sendo assim, a distribuição do tamanho das partículas (perfil granulométrico) do extrato seco de soja e das formulações de GU1 a GU5 e CD1 foi analisada através da porcentagem de partículas retidas em cada malha utilizada, como ilustrado na Tabela 16 e na Figura 17.

Tabela 16. Granulometria dos pós e granulados.

Material avaliado	Malhas (% de partículas retidas em cada malha)					
	1,4 mm	1,0 mm	0,5 mm	0,250 mm	0,125 mm	Coletor
Extrato seco de soja	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	3,38%	96,62%
Formulação GU1	0,0%	10,67%	17,98%	25,87%	23,44%	22,04%
Formulação GU2	0,0%	4,90%	11,05%	15,40%	45,70%	22,95%
Formulação GU3	0,0%	16,80%	35,18%	28,60%	14,28%	5,15%
Formulação GU4	0,0%	2,63%	22,85%	31,53%	32,58%	10,43%
Formulação GU5	0,0%	18,05%	36,15%	31,13%	10,15%	4,53%
Formulação CD1	0,0%	0,0%	0,0%	2,90%	59,50%	37,60%

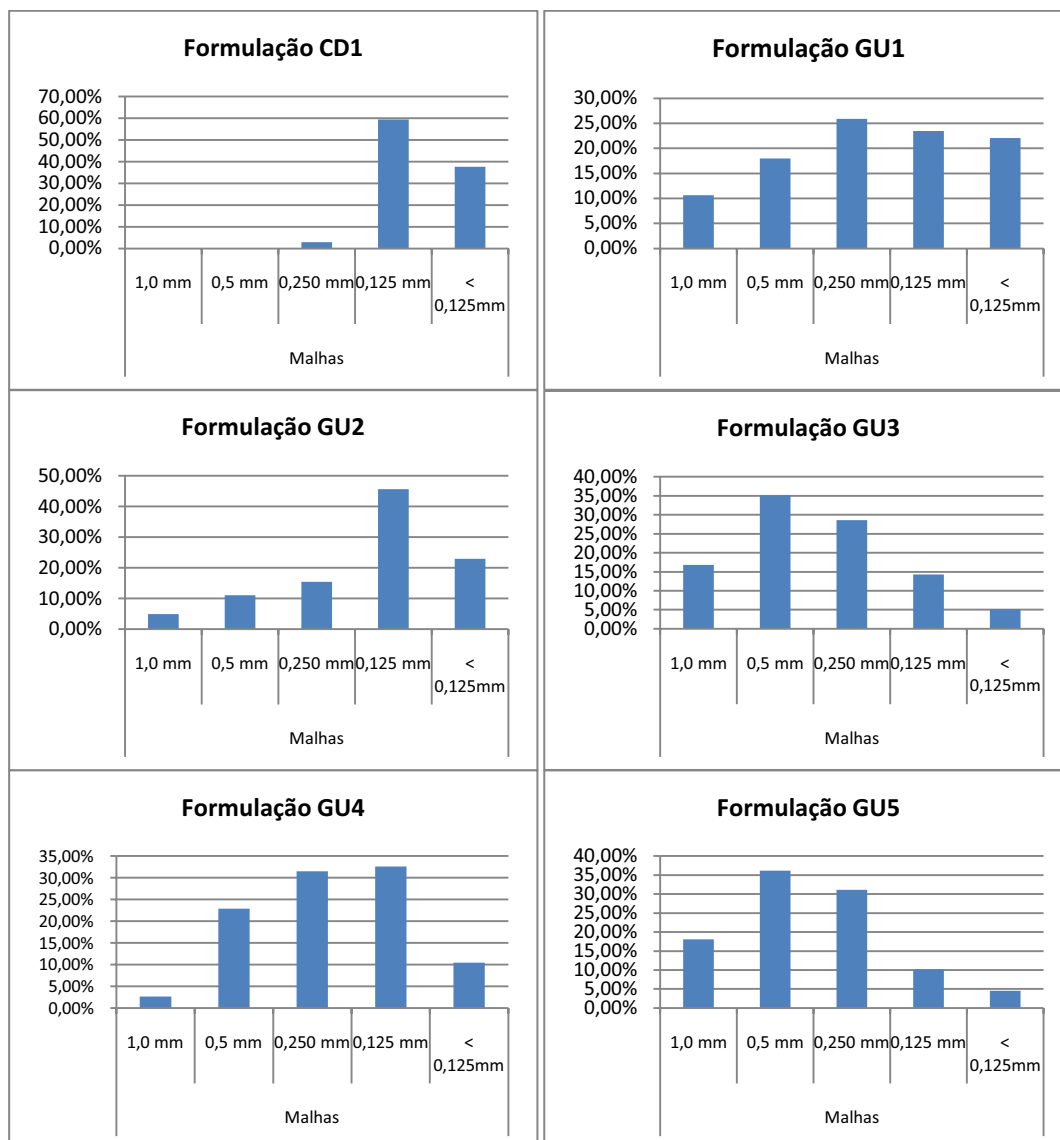


Figura 17. Distribuição de tamanho das partículas das formulações estudadas.

Foi observado que o extrato seco de soja possui grande quantidade de partículas finas, pois 96,62% das partículas passaram por todos os tamises. Essa quantidade de pó fino prejudica muito o fluxo, pois são mais coesivas (STANIFORTH, 2005). A formulação CD1, que foi levada à compressão direta sem granulação prévia, conseqüentemente também demonstrou ter grande quantidade de partículas finas com 59,5% retidas na malha 0,125 mm. Enquanto que a formulação GU5, preparada por granulação úmida, apresentou distribuição do tamanho das partículas mais dispersa, com apenas 4,53% de pó fino, o que contribui para um bom fluxo (EMSHANOVA, 2008).

Essa diferença no tamanho das partículas pode ser observada na Figura 18. Observa-se que o extrato e a mistura seca são constituídos por pós muito finos, e o granulado é um aglomerado de partículas maiores com superfície porosa. Segundo Wu e colaboradores (2007) a porosidade do grânulo pode auxiliar na dissolução.

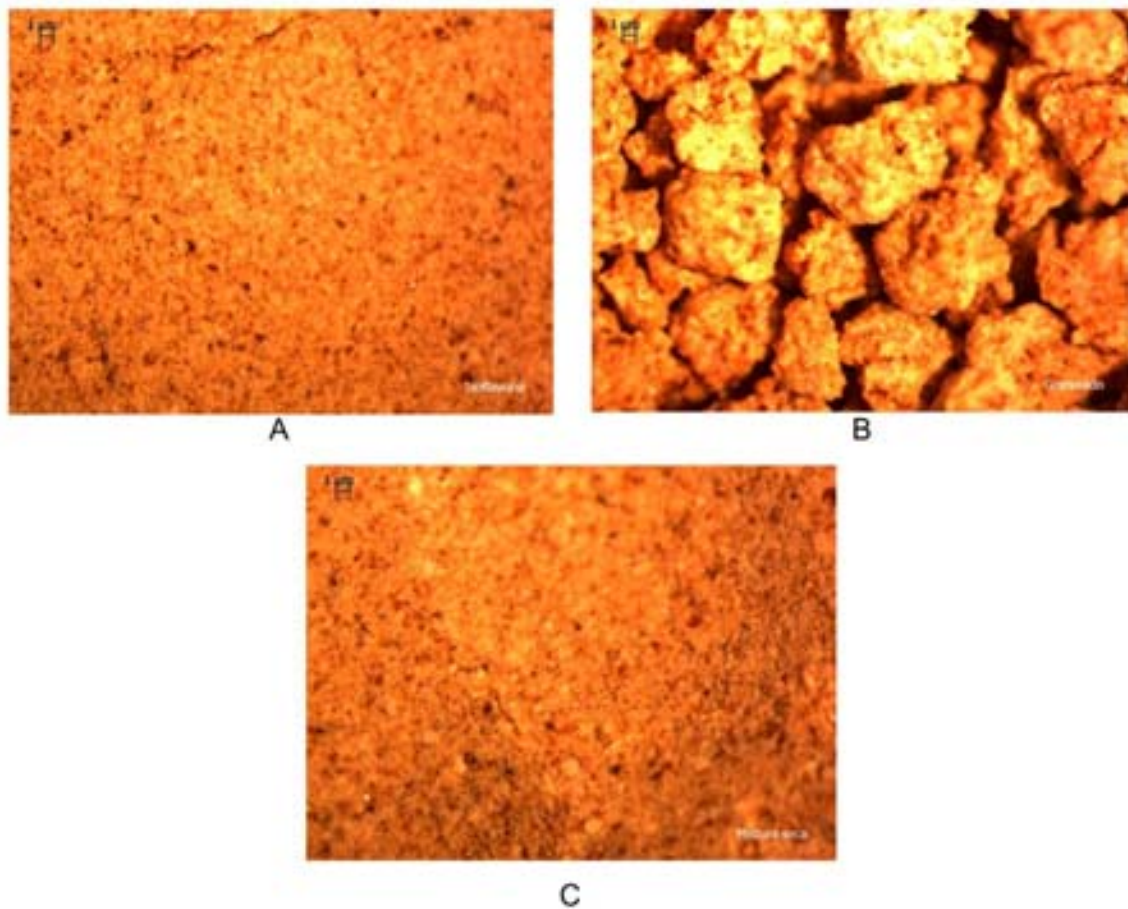


Figura 18: Fotomicrografias de pós e granulados estudados: (A) extrato seco de soja, (B) granulado da formulação GU5, (C) mistura de pós da formulação CD1.

### 5.3.3.2 Análise dos parâmetros físicos dos comprimidos

Os parâmetros físicos dos comprimidos obtidos nas formulações GU1, GU2, GU3, GU4, GU5 e CD1 foram avaliados quanto peso médio, dureza, espessura, desintegração e friabilidade (Tabela 17).

Tabela 17. Resultados de peso médio, dureza, espessura, desintegração e friabilidade.

Formulação	Peso médio (n=20)	Dureza (n=20)	Espessura (n=20)	Desintegração (n=06)	Friabilidade (n=20)
GU1	288,5 mg ± 3,6	9,3 kgf ± 1,2	4,70 mm ± 0,03	20 min	0,0%
GU2	306,8 mg ± 2,3	8,2 kgf ± 2,1	5,10 mm ± 0,06	23 min	0,0%
GU3	301,5 mg ± 3,7	9,4 kgf ± 1,5	4,65 mm ± 0,02	15min	0,0%
GU4	298,7 mg ± 4,6	10,1 kgf ± 1,6	4,59 mm ± 0,02	23 min	0,0%
GU5	301,4 mg ± 3,3	9,2 kgf ± 0,8	4,67 mm ± 0,07	24 min	0,0%
CD1	314,9 mg ± 15,7	9,1 kgf ± 5,2	5,02 mm ± 0,23	16 min	0,5%

Durante a compressão da formulação CD1 houve grande variação de peso e dureza devido ao fluxo pobre desta formulação. O fluxo é fundamental para garantir parâmetros ideais e uniformes durante o processo de compressão (STANIFORTH, 2005; SCHNEIDER; SINKA; COCKS, 2007). Segundo Emshanova (2008) formulações por compressão direta possuem partículas menores, tendo maior superfície de contato e favorecendo assim a desintegração.

As formulações GU1, GU2, GU4 e GU5 proporcionaram bons resultados em relação a peso médio, dureza, espessura e friabilidade. No entanto, os tempos de desintegração não foram satisfatórios (maiores que 20 minutos), pois a USP 30 (2007) descreve que o tempo de desintegração para comprimidos fitoterápicos deve ser de até 20 minutos. Já a formulação GU3 proporcionou bons resultados em todos os parâmetros avaliados. A desintegração mais rápida foi obtida pelo uso do desintegrante croscarmelose sódica e do tensoativo lauril sulfato de sódio. Villanova e Sá (2009) relatam que o uso de tensoativo na formulação reduz a tensão superficial, melhorando a molhabilidade do fármaco e aumentando a sua solubilidade, ou seja, auxiliam na redução do tempo de desintegração dos

comprimidos. E relatam, também, que o uso de desintegrantes facilita a desagregação dos grânulos em partículas menores, quando em contato com a água, aumentando a superfície exposta ao meio e acelerando a dissolução (VILLANOVA e SÁ, 2009). O uso de dois por cento do LSS na formulação foi fundamental para melhorar a desintegração e dissolução do comprimido.

A Tabela 18 mostra o teor de daidzeína e genisteína encontrado nos comprimidos das formulações GU1 a GU5 e CD1, sendo representado em porcentagem em relação ao valor encontrado no extrato.

Tabela 18. Teor de daidzeína e genisteína nas formulações GU1 a GU5 e CD1.

Formulação	Daidzeína (%)	Genisteína (%)
GU1	88,92 ± 1,37	74,62 ± 1,06
GU2	88,92 ± 0,88	95,36 ± 0,47
GU3	92,66 ± 3,21	92,76 ± 3,16
GU4	91,52 ± 0,38	91,33 ± 0,46
GU5	97,55 ± 2,44	97,01 ± 2,28
CD1	91,53 ± 3,43	95,36 ± 0,69

Segundo a USP 30 (2007) o teor de comprimidos deve estar entre 90 e 110%, portanto apenas as formulações CD1, GU3, GU4 e GU5 cumprem este parâmetro. As formulações GU1 e GU2 apresentaram teores abaixo dos valores especificados. Foi observado que a troca do metabissulfito de sódio por butilhidroxitolueno, aparentemente, contribuiu para aumentar o teor de genisteína, pois foi a única alteração entre as fórmulas GU1 e GU2, sendo que não foram alterados os demais excipientes e suas concentrações. Huang e colaboradores (2008) relatam que a genisteína é mais sensível à oxidação, e provavelmente por isso ela tenha sofrido alteração de teor quando alterado o antioxidante. Devido a esse aumento do teor de genisteína, em todas as formulações posteriores foi utilizado o butilhidroxitolueno como antioxidante. Nas formulações GU3, GU4 e GU5 o amido foi retirado e a concentração de celulose microcristalina PH-102 foi aumentada, para obter a dureza necessária sem que houvesse a necessidade da máquina compressora trabalhar de forma forçada para obter a dureza necessária. Com a troca de excipientes a

máquina passou a trabalhar de forma mais suave, sendo este um parâmetro importante a ser avaliado para aumentar a vida útil do equipamento.

O revestimento de todas as formulações foi semelhante, a única diferença foi o corante utilizado, visando mascarar o aspecto original do comprimido. A aparência do comprimido é um fator que influencia na adesão ao tratamento, pois a aparência agradável da forma farmacêutica promove melhor aceitação pelo paciente (ALDERBORN, 2005). Como os comprimidos de isoflavona desenvolvidos neste trabalho são para mulheres que se encontram no período da menopausa foi escolhido o corante vermelho ponceau para o revestimento, que na concentração de 0,05% na suspensão de revestimento, proporcionou comprimidos na cor rosa (Figura 19).



Figura 19. Comprimidos de isoflavona obtidos pela formulação GU3.

## 5.4 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

### 5.4.1 Ensaio de solubilidade

As Tabelas 19 e 20 mostram as porcentagens de daidzeína e genisteína dissolvidas, respectivamente, em diferentes meios de dissolução. Observa-se que os meios água com lauril sulfato de sódio dissolvem maior porcentagem de daidzeína e genisteína. Os tensoativos são bastante empregados para modificar o meio de dissolução permitindo solubilizar fármacos de baixa solubilidade, como observado no caso da daidzeína e da genisteína (MANIASSO, 2001). Observa-se que a genisteína possui maior quantidade dissolvida nos meios aquosos, quando comparada com a

daidzeína. Tal fenômeno pode ser explicado devido a genisteína apresentar em sua estrutura molecular uma hidroxila a mais do que a daidzeína, tornando-a mais polar (Figura 2).

Durante a realização dos ensaios de solubilidade observou-se que no tempo de 24 horas o meio HCl 0,1 mol/L com 0,5% de lauril sulfato de sódio ocorreu alteração de cor, passando de amarelo, como os demais, para rosa (Figura 20). Segundo Genovese e Lajolo (2001), as isoflavonas, principalmente a genisteína, sofrem degradação quando colocadas em refluxo por 2 horas com HCl 2 mol/L em banho de água fervente. Como o extrato ficou em HCl por 24 horas, provavelmente a alteração de cor se deu pela degradação das isoflavonas.

Tabela 19. Porcentagens de daidzeína dissolvida em diferentes meios de dissolução.

Meios de dissolução	1 hora	24 horas
	% dissolvida	% dissolvida
Água deionizada	2,30 ± 0,05	3,22 ± 0,05
HCl 0,1 mol/L	2,28 ± 0,13	2,49 ± 0,03
Tampão acetato de sódio pH 4,5	2,25 ± 0,03	2,49 ± 0,03
Água + 0,5% de LSS	5,81 ± 0,03	6,97 ± 0,21
HCL 0,1 mol/L + 0,5% de LSS	3,90 ± 0,08	4,53 ± 0,11
Tampão acetato de sódio pH 4,5 + 0,5% de LSS	5,22 ± 0,20	6,05 ± 0,03
Água + 3,0% de LSS	17,30 ± 2,65	25,03 ± 0,64
Água + 3,0% de Tween 80	14,17 ± 0,76	20,63 ± 0,24
Água + 3,0% de Tween 20	12,27 ± 1,93	16,04 ± 0,58
Água + 1,0% de LSS	8,47 ± 0,08	11,99 ± 0,53
Água + 1,5% de LSS	11,44 ± 0,00	15,53 ± 0,45

Tabela 20. Porcentagens de genisteína dissolvida em diferentes meios de dissolução

Meios de dissolução	1 hora	24 horas
	% dissolvida	% dissolvida
Água deionizada	6,31 ± 0,13	9,53 ± 0,20
HCl 0,1mol/L	6,22 ± 0,00	7,46 ± 0,07
Tampão acetato de sódio pH 4,5	6,22 ± 0,00	7,65 ± 0,46
Água + 0,5% de LSS	24,73 ± 0,83	44,11 ± 1,19
HCL 0,1 mol/L + 0,5% de LSS	11,67 ± 0,96	19,66 ± 1,00
Tampão acetato de sódio pH 4,5 + 0,5% de LSS	15,81 ± 2,87	34,21 ± 0,33
Água + 3,0% de LSS	38,15 ± 7,20	82,54 ± 2,72
Água + 3,0% de Tween 80	30,99 ± 4,84	76,06 ± 7,37
Água + 3,0% de Tween 20	30,05 ± 10,77	65,93 ± 2,59
Água + 1,0% de LSS	30,68 ± 4,40	75,97 ± 4,98
Água + 1,5% de LSS	31,44 ± 0,13	78,69 ± 0,86



Figura 20. Comparação de cor entre os meios água com 0,5% de LSS (lado esquerdo) e HCl 0,1 mol/L (lado direito) ao final de 24h.

Daruházi e colaboradores (2008) relatam que as isoflavonas possuem baixa solubilidade em água, sendo necessário o uso de adjuvantes para melhorar a solubilidade delas em meio aquoso. Dwiecki e colaboradores (2009) relatam que, além da baixa solubilidade da daidzeína em água, ela é degradada em meio aquoso com o passar do tempo. Portanto, a pequena porcentagem de daidzeína dissolvida após o período de 24 horas pode ter sido influenciada pela sua instabilidade em meio aquoso com conseqüente processo de degradação, fato este que deverá ser confirmado, posteriormente, por ensaio de estabilidade do ativo em solução.

Após a análise dos resultados foi possível verificar que houve uma baixa porcentagem de daidzeína dissolvida em todos os meios utilizados, visto que todos os meios são compostos por veículos aquosos. No entanto, pode-se perceber que mesmo tendo dissolvido uma pequena porcentagem ao final do ensaio, o meio contendo água e 3,0% de lauril sulfato de sódio apresentou um maior percentual de dissolução quando comparado com os demais.

Levando em consideração todas essas variações, foram escolhidos para o desenvolvimento do método de dissolução os meios água com 3% de LSS e com 1,5% de LSS, para verificar a influência da quantidade de LSS durante o ensaio de

dissolução, pois os meios água com LSS foram os que apresentaram maior porcentagem de daidzeína e genisteína dissolvidas.

#### 5.4.2 Planejamento fatorial

Os dados gerados pelo planejamento fatorial foram analisados com o auxílio do programa GNU Octave versão 3.2.2 (2009). Foram analisados os dados obtidos das coletas nos tempos 60 e 90 minutos.

##### 5.4.2.1 Daidzeína

###### 5.4.2.1.1 Coleta no tempo 60 minutos.

A análise de variância resultou os dados demonstrados na Tabela 21, onde SQ representa a soma dos quadrados, GL o grau de liberdade, MQ a média dos quadrados, F o teste de hipóteses e P a significância estatística.

Tabela 21. Análise de variância Daidzeína 60 minutos.

	Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	P	R <sup>2</sup> =	98,59%
Regressão	Entre	5201,5844	7	743,0835	159,5262	1,36397E-13	V=	4,66
Resíduo	Dentro	74,5291	16	4,6581		0,0000	DP=	2,16
Total	Total	5276,1134	23					

A significância estatística revelou um  $p < 0,001$ , demonstrando que os dados apresentam um alto grau de confiabilidade. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi próximo de 1 revelando uma boa correlação entre as variáveis, e o desvio padrão foi  $\pm 2,16$ .

A regressão linear resultou a seguinte equação:

$$y = 58,5 + 7,5 * \%LSS + 3,59 * Ap. + 2,62 * rpm + 1,49 * \%LSS * Ap. - 1,73 * \%LSS * vol$$

(Equação 4)

A equação 4 demonstra que os fatores LSS, aparato e velocidade de rotação apresentam efeito primário positivo, tendo os níveis (+) uma maior resposta em concentração de daidzeína no tempo de 60 minutos. Logo, as condições ideais devem respectivamente ser: água + 3%LSS, pá 100 rpm. O fator volume não apresentou efeito primário estatisticamente significativo, no entanto o seu efeito sinérgico com o fator meio de dissolução foi menor que zero, revelando um melhor

desempenho quando utilizado o volume de 900 mL. Na Figura 21 pode-se observar tanto o efeito primário positivo do meio de dissolução, como o efeito sinérgico do volume com o meio de dissolução. Na Figura 22 pode-se observar os efeitos primários positivos do aparato e da velocidade de rotação.

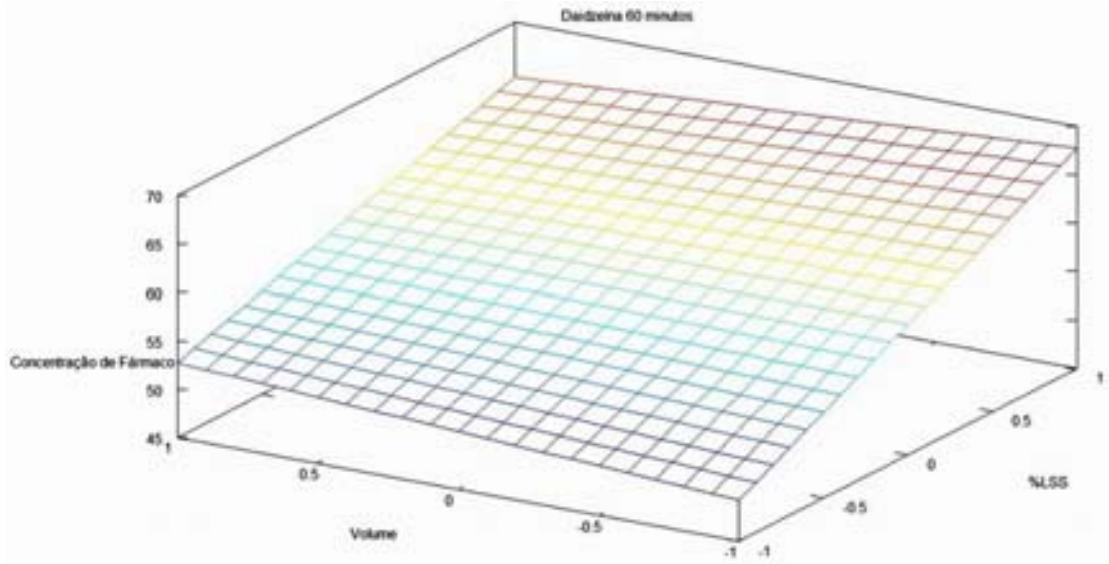


Figura 21. Superfície de resposta referente à influência das variáveis “concentração de lauril sulfato de sódio” e “volume do meio” sobre a concentração de daidzeína dissolvidas em 60 minutos do ensaio de dissolução.

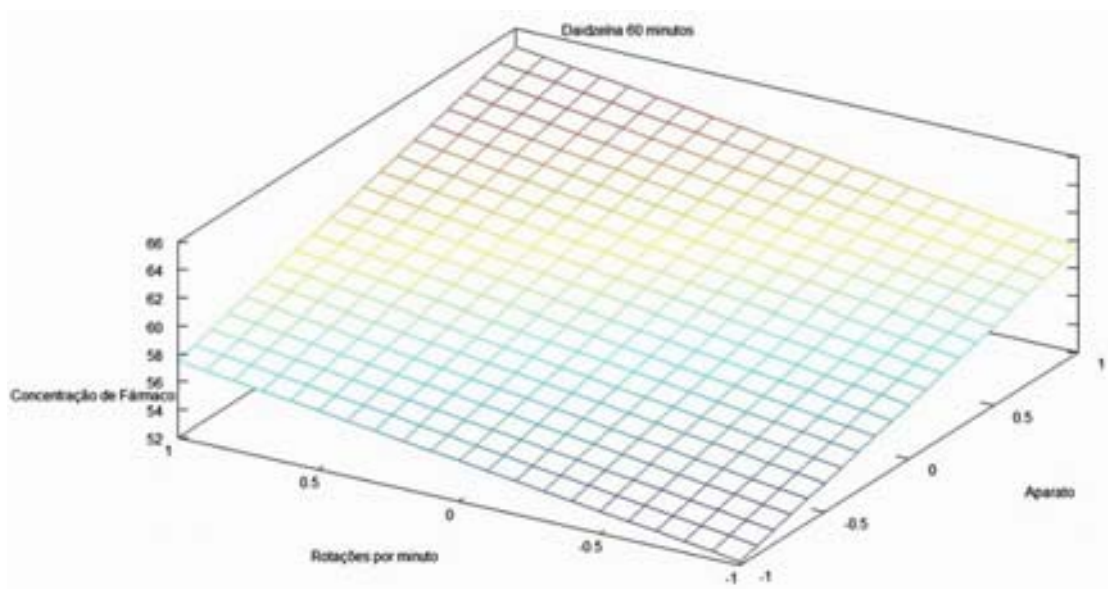


Figura 22. Superfície de resposta referente à influência das variáveis “aparato” e “rotações” sobre a concentração de daidzeína dissolvidas em 60 minutos do ensaio de dissolução.

#### 5.4.2.1.2 Coleta no tempo 90 minutos.

A análise de variância resultou os dados conforme Tabela 22.

Tabela 22. Análise de variância Daidzeína 90 minutos.

	Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	P	R <sup>2</sup> =	98,84%
Regressão	Entre	4513,9652	7	644,8522	194,8562	2,82570E-14	V=	3,31
Resíduo	Dentro	52,9500	16	3,3094		0,0000	DP=	1,82
Total	Total	4566,9152	23					

A significância estatística revelou um  $p < 0,001$ , demonstrando que os dados apresentam um alto grau de confiabilidade. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi próximo de 1 revelando uma boa correlação entre as variáveis, e o desvio padrão foi  $\pm 1,82$ .

A regressão linear resultou a seguinte equação:

$$y = 67,21 + 6,87\%LSS + 4,24*Ap. + 1,94*rpm + 0,93\%LSS*Ap. - 0,85\%LSS*vol$$

(Equação 5)

A equação 5 permite inferir que os resultados obtidos com as coletas em 90 minutos são semelhantes aos obtidos nas coletas com 60 minutos, onde os fatores LSS, aparato e velocidade de rotação apresentam efeito primário positivo, tendo os níveis (+) uma maior resposta em concentração de daidzeína no tempo de 90 minutos. Ou seja, as condições ideais devem respectivamente ser: água + 3%LSS, pá 100 rpm . O fator volume não apresentou efeito primário estatisticamente significativo, no entanto o seu efeito sinérgico com o fator meio de dissolução foi menor que zero, revelando um melhor desempenho quando utilizado o volume de 900 mL. Na Figura 23 pode-se observar tanto o efeito primário positivo do meio de dissolução, como o efeito sinérgico do volume com o meio de dissolução. Na Figura 24 pode-se observar os efeitos primários positivos do aparato e da velocidade de rotação.

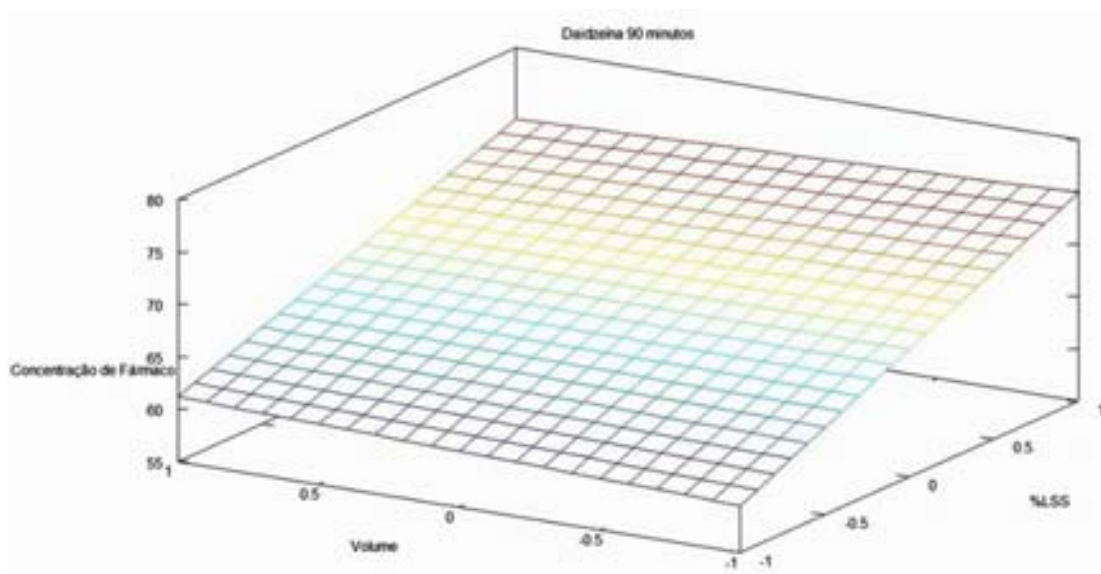


Figura 23. Superfície de resposta referente à influência das variáveis “concentração de lauril sulfato de sódio” e “volume do meio” sobre a concentração de daidzeína dissolvidas em 90 minutos do ensaio de dissolução.

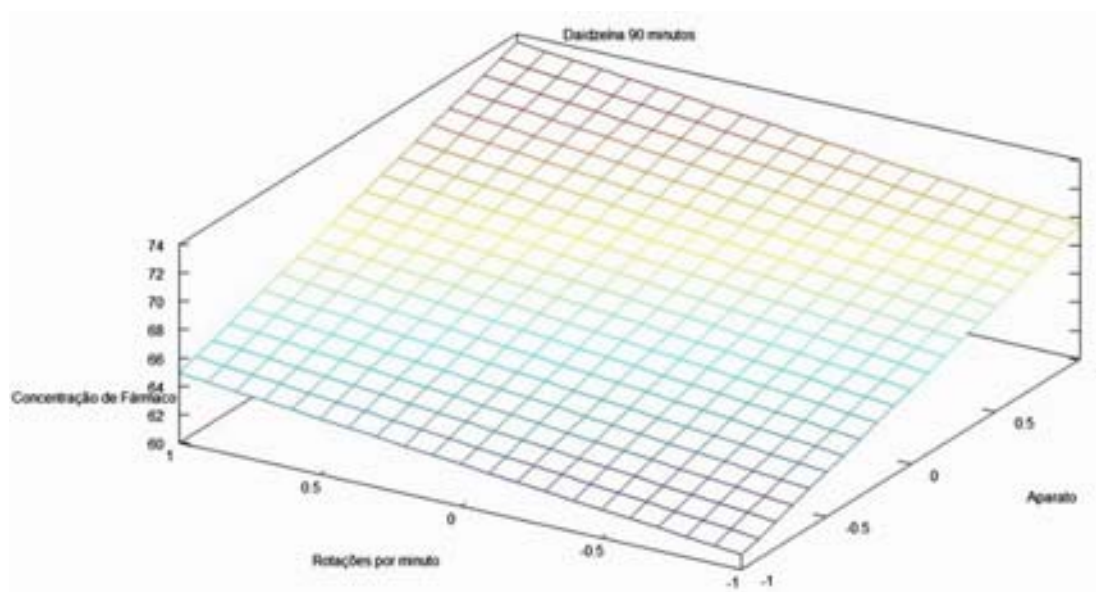


Figura 24. Superfície de resposta referente à influência das variáveis “aparato” e “rotações” sobre a concentração de daidzeína dissolvidas em 90 minutos do ensaio de dissolução.

#### 5.4.2.2 Genisteína

##### 5.4.2.2.1 Coleta no tempo 60 minutos.

A análise de variância resultou os dados conforme Tabela 23.

Tabela 23. Análise de variância Genisteína 60 minutos.

	Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	P	R <sup>2</sup> =	97,37%
Regressão	Entre	3145,3945	7	449,3421	84,6005	1,92006E-11	V=	5,31
Resíduo	Dentro	84,9815	16	5,3113		0,0000	DP=	2,30
Total	Total	3230,3759	23					

A significância estatística revelou um  $p < 0,001$ , demonstrando que os dados apresentam um alto grau de confiabilidade. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi próximo de 1 revelando uma boa correlação entre as variáveis, e o desvio padrão foi  $\pm 2,30$ .

A regressão linear resultou a seguinte equação:

$$y = 71,59 + 3,88*\%LSS + 3,26*Ap. + 3,9*rpm - 1,27*\%LSS*rpm - 2,37*\%LSS*vol.$$

(Equação 6)

A equação 6 demonstra que os fatores LSS, aparato e velocidade de rotação, assim como para a daidzeína, apresentam efeito primário positivo, tendo os níveis (+) uma maior resposta em concentração de genisteína no tempo de 60 minutos. As condições ideais continuam sendo respectivamente: água + 3%LSS, pá 100 rpm . O fator volume não apresentou, novamente, efeito primário estatisticamente significativo, no entanto o seu efeito sinérgico com o fator meio de dissolução foi menor que zero, revelando um melhor desempenho quando utilizado o volume de 900 mL. Foi observado que o efeito secundário entre fatores meio de dissolução e aparato não foi estatisticamente significativo segundo essa equação. Na Figura 25 pode-se observar tanto o efeito primário positivo do meio de dissolução, como o efeito sinérgico do volume com o meio de dissolução. Na Figura 26 pode-se observar os efeitos primários positivos do aparato e da velocidade de rotação.

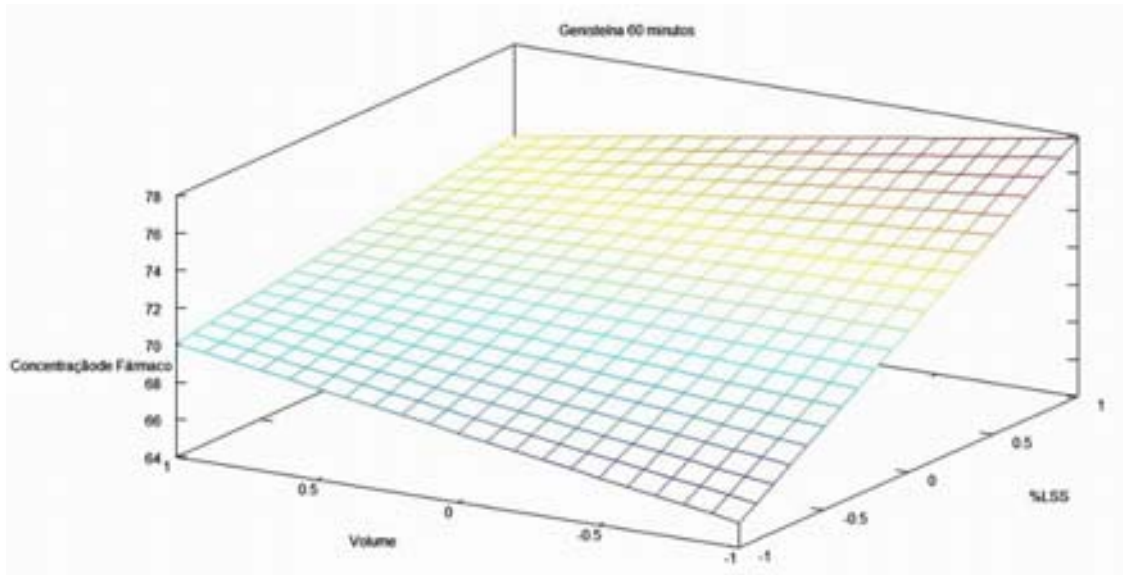


Figura 25. Superfície de resposta referente à influência das variáveis “concentração de lauril sulfato de sódio” e “volume do meio” sobre a concentração de genisteína dissolvidas em 60 minutos do ensaio de dissolução.

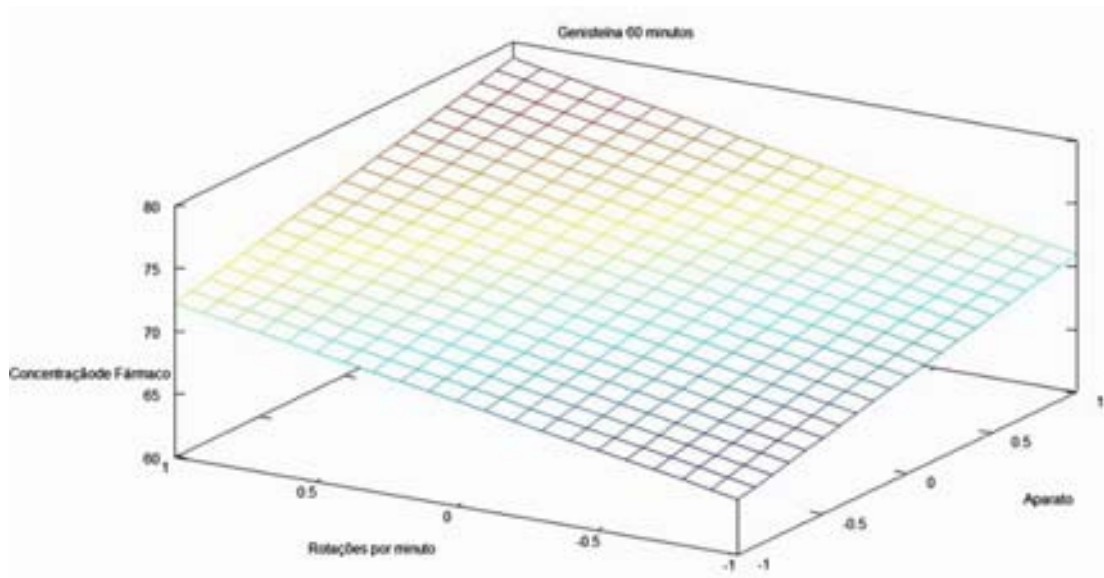


Figura 26. Superfície de resposta referente à influência das variáveis “aparato” e “rotações” sobre a concentração de genisteína dissolvidas em 60 minutos do ensaio de dissolução.

#### 5.4.2.2.2 Coleta no tempo 90 minutos.

A análise de variância resultou os dados conforme Tabela 24.

Tabela 24. Análise de variância Genisteína 90 minutos.

	Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	P	R <sup>2</sup> =	99,16%
Regressão	Entre	1835,7161	7	262,2452	270,3988	2,12423E-15	V=	0,97
Resíduo	Dentro	15,5175	16	0,9698		0,0000	DP=	0,98
Total	Total	1851,2336	23					

A significância estatística revelou um  $p < 0,001$ , demonstrando que os dados apresentam um alto grau de confiabilidade. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi próximo de 1 revelando uma boa correlação entre as variáveis, e o desvio padrão foi  $\pm 0,98$ .

A regressão linear resultou a seguinte equação:

$$y = 80,21 + 1,17\%LSS + 4,19*Ap. + 1,88*rpm - 0,83*Vol. - 0,46\%LSS*Ap. - 1,41\%LSS*rpm - 1,83\%LSS*Vol. \text{ (Equação 7)}$$

A equação 7 demonstra que os fatores LSS, aparato e velocidade de rotação apresentam efeito primário positivo, tendo os níveis (+) uma maior resposta em concentração de genisteína no tempo de 90 minutos, concordando com os resultados obtidos no item 5.3.1.1. Ou seja, as condições ideais continuam sendo respectivamente: água + 3% LSS, pá 100 rpm. Porém, diferente dos resultados anteriores, o fator volume apresentou efeito primário estatisticamente significativo negativo, concordando que o melhor desempenho se deu quando utilizado o volume de 900 mL. Os efeitos sinérgicos, secundários, LSS x aparato, LSS x rotações, LSS x volume, foram todos negativos, sendo o maior valor em módulo LSS x Volume. Na Figura 27 pode-se observar tanto o efeito primário positivo do meio de dissolução, como o efeito sinérgico do volume com o meio de dissolução. Na Figura 28 pode-se observar os efeitos primários positivos do aparato e da velocidade de rotação. Na Figura 29 pode-se observar a o efeito sinérgico negativo entre meio de dissolução e velocidade de rotação.

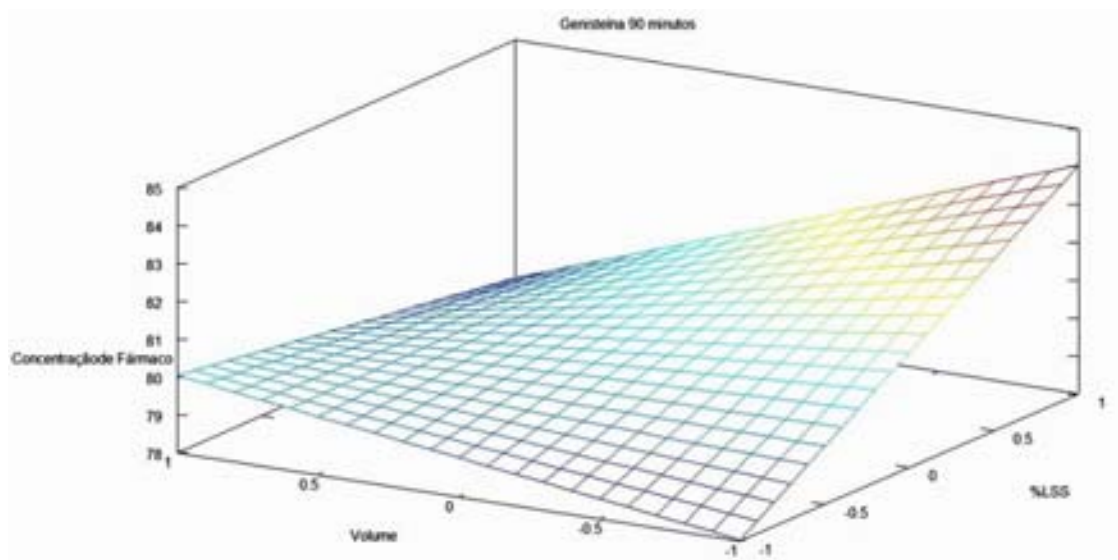


Figura 27. Superfície de resposta referente à influência das variáveis “concentração de lauril sulfato de sódio” e “volume do meio” sobre a concentração de genisteína dissolvidas em 90 minutos do ensaio de dissolução.

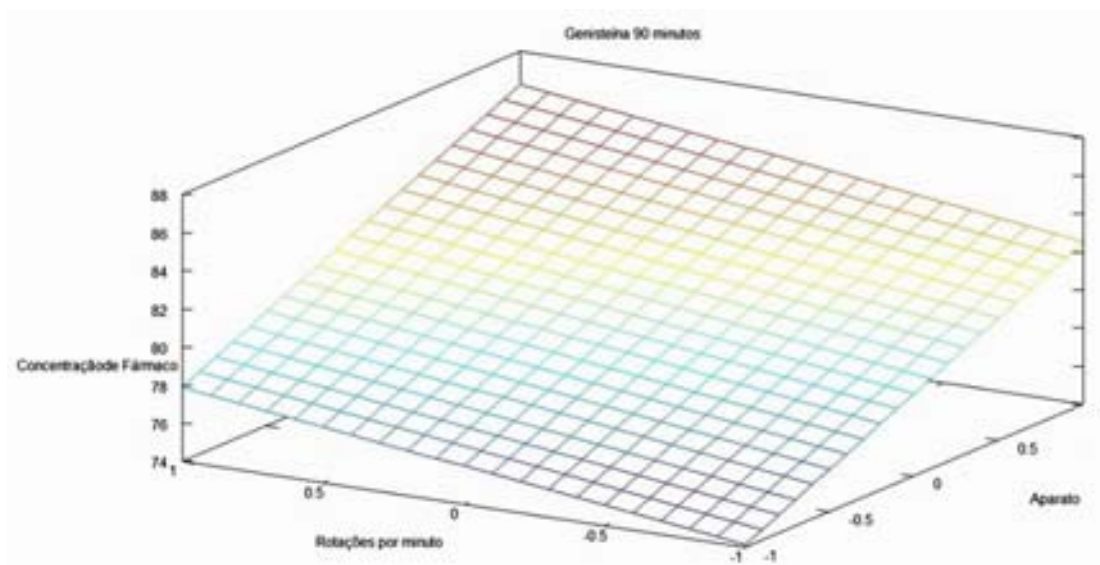


Figura 28. Superfície de resposta referente à influência das variáveis “aparato” e “rotações” sobre a concentração de genisteína dissolvidas em 90 minutos do ensaio de dissolução.

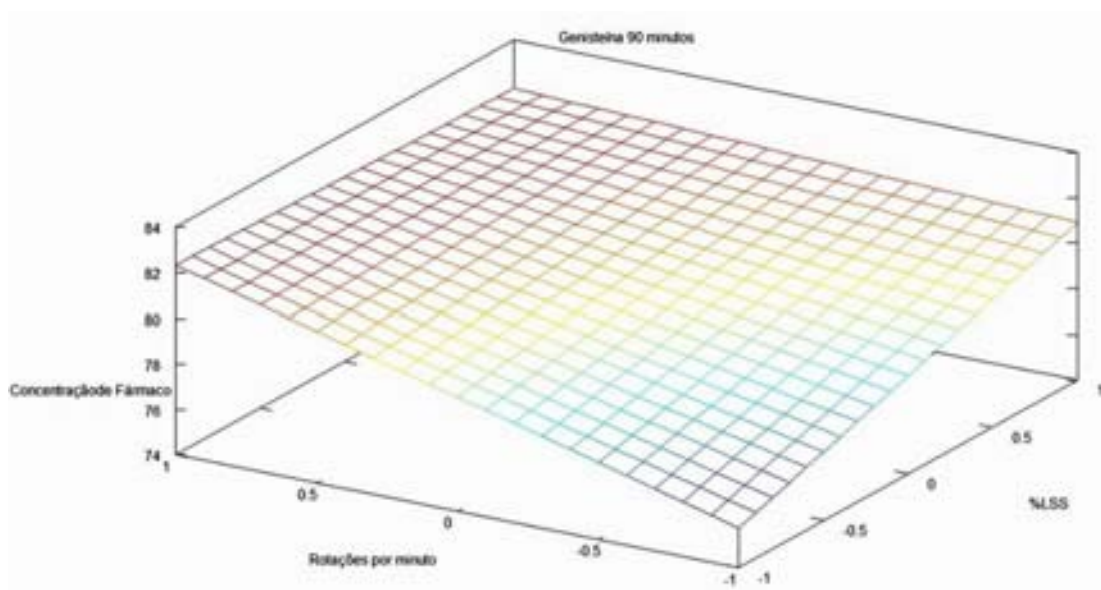


Figura 29. Superfície de resposta referente à influência das variáveis “concentração de lauril sulfato de sódio” e “rotações” sobre a concentração de genisteína dissolvidas em 90 minutos do ensaio de dissolução.

De acordo com os resultados citados acima foi definido os seguintes parâmetros para o método de dissolução:

Meio de dissolução: Água + LSS 3%

Aparato: Pá

Velocidade de rotação: 100 rpm

Volume de meio: 900 mL

#### 5.4.3 Perfil de dissolução das formulações desenvolvidas

Após a definição das condições utilizadas durante o desenvolvimento do método de dissolução para comprimidos de isoflavona da soja pode-se analisar as seis formulações desenvolvidas ao longo do trabalho.

Segundo a USP 30 (2007) o uso de tensoativo, como LSS, no meio de dissolução pode auxiliar na dissolução de fármacos pouco solúveis em água. Como no caso dos marcadores daidzeína e genisteína que são pouco solúveis em água. O volume de 900 mL de meio definido no método, segundo a USP 30 (2007) é o mais utilizado. A velocidade de rotação de 100 rpm, também, está dentro dos critérios aceitos pela USP 30 (2007). Sendo o aparato pá o mais comumente utilizado para comprimidos (USP 30, 2007). Tanto na USP 30 (2007), como na Farmacopéia

Brasileira (1988) ainda não há descrição de ensaio de dissolução de fitoterápicos. Atualmente a ANVISA (2010) ainda não exige ensaio de dissolução para registro de fitoterápicos. Porém por se tratar de um ensaio *in vitro* que tem uma predição relevante do desempenho do medicamento *in vivo*, é de fundamental importância desenvolvê-lo (TZANAVARAS et. al., 2008), mesmo que seja complexo, como no caso de fitoterápicos.

A análise foi feita através do perfil de dissolução obtido com o ensaio de dissolução realizado em sextuplicata e, a melhor formulação foi escolhida levando-se em consideração a maior porcentagem dissolvida para os dois marcadores avaliados (daidzeína e genisteína). Foi determinado que 80% de cada marcador deveriam ser dissolvidos no tempo de 90 minutos.

As Tabelas 25 e 26 e as Figuras 30 e 31 demonstram que das formulações avaliadas, a GU3 foi a que proporcionou melhor desempenho, pois promoveu a dissolução da maior quantidade de daidzeína e genisteína ao longo de todo o ensaio, permitindo que mais de 80% dos dois marcadores se dissolvessem em 90 minutos.

Tabela 25. Comparação da porcentagem de daidzeína dissolvida entre as formulações por tempo.

Tabela comparativa entre as formulações - Daidzeína (Média)											
Formulações/Tempo	5 min	10 min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min	150 min		
GU1	6,34 ± 2,2	16,45 ± 4,89	26,87 ± 6,60	50,40 ± 7,39	64,34 ± 6,20	70,78 ± 2,22	76,01 ± 1,60	76,69 ± 0,58	78,94 ± 0,76		
GU2	3,73 ± 0,41	10,22 ± 1,33	18,14 ± 1,96	40,59 ± 4,04	57,55 ± 5,47	68,18 ± 3,16	77,68 ± 1,76	82,11 ± 2,00	84,68 ± 2,12		
GU3	12,56 ± 0,59	23,15 ± 0,88	34,57 ± 2,51	55,73 ± 2,92	68,66 ± 1,54	74,94 ± 1,54	80,74 ± 0,94	82,38 ± 1,12	84,83 ± 1,00		
GU4	4,90 ± 0,59	10,16 ± 1,23	17,21 ± 1,71	31,95 ± 3,22	46,11 ± 4,54	59,32 ± 3,45	73,68 ± 2,45	79,01 ± 2,03	81,44 ± 1,20		
GU5	4,30 ± 1,18	9,92 ± 1,14	18,08 ± 0,56	36,53 ± 1,07	52,44 ± 1,70	64,37 ± 2,90	69,06 ± 31,88	81,29 ± 1,36	84,94 ± 1,49		
CD1	4,15 ± 0,83	9,10 ± 2,39	14,29 ± 4,34	30,49 ± 9,30	46,39 ± 14,15	55,99 ± 13,49	69,39 ± 8,27	78,97 ± 5,25	84,16 ± 2,39		

Tabela 26. Comparação da porcentagem de genisteína dissolvida entre as formulações por tempo.

Tabela comparativa entre as formulações - Genisteína (Média)											
Formulações/Tempo	5 min	10 min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min	150 min		
GU1	7,14 ± 1,72	14,78 ± 4,05	23,33 ± 5,72	43,82 ± 7,45	55,26 ± 6,17	60,17 ± 2,19	63,36 ± 1,76	62,63 ± 1,12	63,52 ± 1,12		
GU2	6,31 ± 0,50	13,78 ± 1,56	22,72 ± 2,29	47,82 ± 5,03	66,91 ± 6,61	77,21 ± 3,41	83,36 ± 2,52	84,68 ± 2,49	85,23 ± 1,94		
GU3	21,89 ± 0,94	33,90 ± 0,72	46,89 ± 3,25	71,25 ± 3,15	85,28 ± 1,67	88,87 ± 2,37	92,20 ± 0,64	92,30 ± 0,89	92,57 ± 1,55		
GU4	7,66 ± 0,68	13,42 ± 1,33	21,22 ± 1,97	37,95 ± 3,78	53,37 ± 5,19	67,48 ± 4,14	80,92 ± 1,82	83,43 ± 2,40	83,51 ± 0,57		
GU5	7,61 ± 0,27	13,20 ± 1,28	22,11 ± 0,67	42,79 ± 1,18	59,87 ± 2,02	72,93 ± 3,46	79,34 ± 10,80	84,82 ± 1,66	86,80 ± 1,63		
CD1	10,38 ± 2,08	13,51 ± 3,10	19,98 ± 5,51	39,74 ± 11,69	57,89 ± 17,72	66,67 ± 14,99	78,23 ± 7,86	85,46 ± 5,43	87,59 ± 1,47		

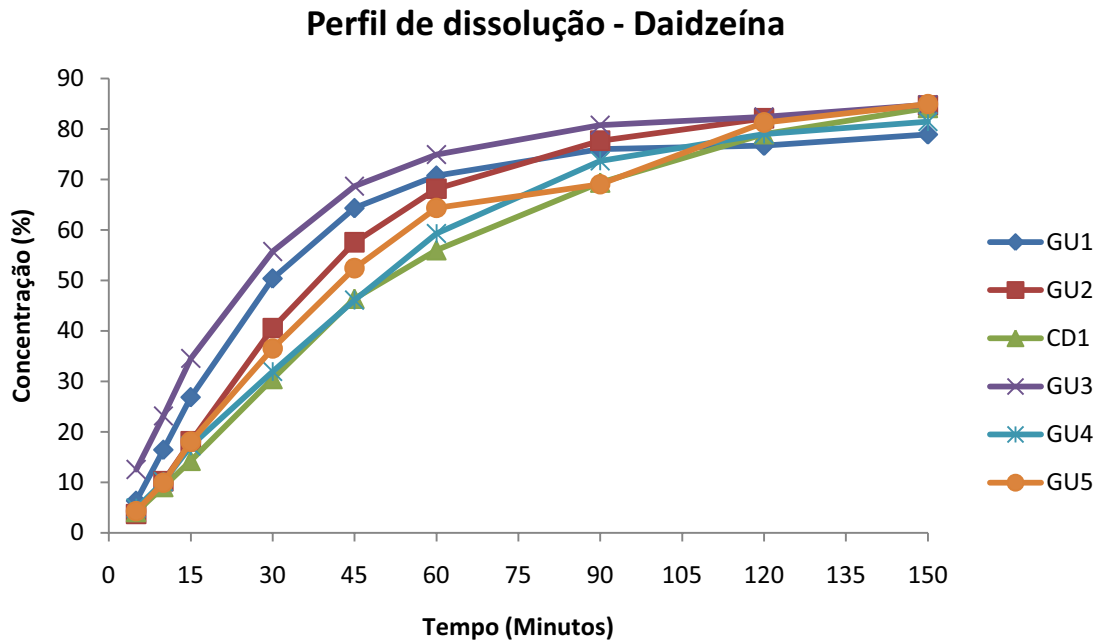


Figura 30. Curvas dos perfis de dissolução de daidzeína das formulações.

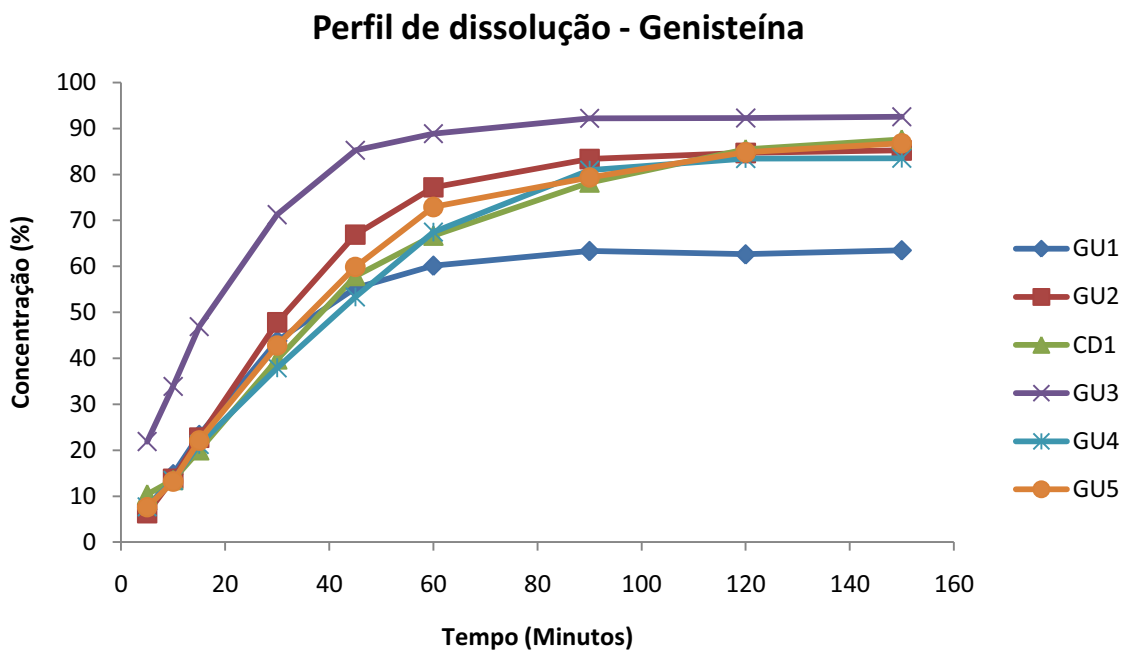


Figura 31. Curvas dos perfis de dissolução de genisteína das formulações.

A dissolução, assim como a desintegração, mais rápida da formulação GU3 foi obtida pelo uso do desintegrante croscarmelose sódica e do tensoativo lauril sulfato de sódio. Villanova e Sá (2009) relatam que o uso de tensoativo na formulação reduz a tensão superficial, melhorando a molhabilidade do fármaco e aumentando a sua solubilidade, ou seja, auxiliam na redução do tempo de dissolução dos comprimidos. E relatam, também, que o uso de desintegrantes facilita a desagregação dos grânulos em partículas menores, quando em contato com a água, aumentando a superfície exposta ao meio e acelerando a dissolução (VILLANOVA e SÁ, 2009). O uso de dois por cento do LSS na formulação e três por cento no meio de dissolução foi fundamental para melhorar a dissolução do comprimido. A dureza e o tamanho dos pós e granulados que constituem o comprimido também influenciam na dissolução (USP 30, 2007).

## 6 CONCLUSÃO

O extrato não apresentou contaminação microbiológica, pois não houve crescimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*.

A melhor condição para quantificação de daidzeína e genisteína por CLAE foi: método isocrático, metanol com 0,1% de ácido acético, água com 0,1% de ácido acético e acetonitrila na proporção 64:32:4 como fase móvel, coluna de fase reversa C18 150mm x 4,6mm x 5µm, fluxo de 0,7 mL/min, temperatura da coluna de 30°C, comprimento de onda de 254 nm, e volume de injeção de 10 µL. Sob essas condições, os picos foram simétricos, tiveram resolução maior que 2, com tempos de retenção de 3,13 e 3,72 da daidzeína e genisteína, respectivamente.

O teor dos marcadores encontrados no extrato foi 27,8% e 11,1% de daidzeína e genisteína, respectivamente, ou seja, cerca de 40% de isoflavonas.

Nos resultados da análise térmica não foram observadas possíveis interações do extrato com os excipientes testados.

Dentre as seis formulações desenvolvidas de comprimidos de isoflavona, sendo uma por compressão direta e cinco por granulação úmida, o melhor método de obtenção dos comprimidos foi a granulação úmida, pois apresentou melhores propriedades compressionais com velocidade de escoamento variando entre 4,5 e 6,7 s/100g e compressibilidade entre 16,85% e 26,06%.

A formulação GU3, feita por granulação úmida, foi a que apresentou melhor desempenho segundo os parâmetros analisados, apresentando teor de 92,66% e 92,76% de daidzeína e genisteína, respectivamente, desintegração de 15 minutos, e fluxo caracterizado como excelente.

No desenvolvimento do método analítico para dissolução dos comprimidos de isoflavona foi feito o teste de solubilidade para definir o melhor meio, sendo o meio água com 3% de lauril sulfato de sódio o que dissolveu 80% de daidzeína e genisteína na temperatura de 37°C no tempo de 90 minutos, intervalo atendendo as recomendações dos compêndios oficiais. Os demais parâmetros definidos através do desenvolvimento do método foram aparato pá, velocidade de rotação de 100 rpm e 900 mL de volume de meio.

Os resultados mostraram a possibilidade de obtenção de formas farmacêuticas sólidas promissoras para veiculação de isoflavona, além de

metodologias otimizadas para controle de qualidade para análise da matéria-prima e do produto acabado.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem contribuir com as políticas públicas do Ministério da Saúde viabilizando comprimidos de isoflavona de soja com qualidade estabelecida, os quais podem servir de parâmetro para a indústria farmacêutica nacional atender os pré-requisitos de qualidade do medicamento fitoterápico a ser distribuído pelo Sistema Único de Saúde.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERBORN, G. Comprimidos e compressão, In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Capítulo 27.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr, L, V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**, 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007, Capítulo 6.

ANDO, M.; ITO, R.; OZEKI, Y.; NAKAYAMA, Y.; NABESHIMA, T. Evaluation of a novel sugar coating method for moisture protective tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, p. 319–328, 2007.

APERS, S.; NAESSENS, T.; STEEN, K. V. D.; CUYCKENS, F.; CLAEYS, M.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. Fast high-performance liquid chromatography method for quality control of soy extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, p. 107–112, 2004.

BACHER, C.; OLSEN, P.M.; BERTELSEN, P.; SONNERGAARD, J.M. Compressibility and compactibility of granules produced by wet and dry granulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 358, p. 69–74, 2008.

BAZZO, G. C.; SILVA, M. A. S. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 315–322, 2005.

BONACUCINA, G.; CESPI, M.; MISICI-FALZI, M.; PALMIERI, G. F. Mechanical characterization of pharmaceutical solids: A comparison between rheological tests performed under static and dynamic porosity conditions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 277–283, 2007.

BORGES, D.B. Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. *Reissek* e *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p.229-236, 2005.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. D.O.U. 18 de março de 2004.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. D.O.U. 02 de junho de 2003.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Orientações sobre “Controle de qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos”. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/medicamentos>>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2010.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**, 4 ed., São Paulo: Atheneu, 1988.

BRASIL, Portaria nº 2.982, de 26 de novembro de 2009. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. D.O.U. 01 de dezembro de 2009.

CAMPOS, M. G.; MATOS, M. P.; CÂMARA, M. T.; CUNHA, M. M. The variability of isoflavones in soy seeds and the possibility of obtaining extracts for over the counter tablet preparations that can be standardized. **Industrial Crops and Products**, v. 26, p. 85–92, 2007.

CAMPOS, M. G. et al. Comparative analysis of over-the-counter tablet preparations of isoflavones extracted from soy available in Portugal. **Natural Product Communications**, v. 1, n. 11, p. 973-980, 2006.

CÉSAR, I. C.; BRAGA, F. C.; VIANNA-SOARES, C. D.; NUNAN, E. A.; BARBOSA, T. A. F.; MOREIRA-CAMPOS, L.M. Determinação da daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 616-625, 2007.

CÉSAR, I. C.; BRAGA, F.C; SOARES, C. D. V., NUAN, E. A.; PIANETTI, G. A.; CONDESSA, F. A.; BARBOSA, T. A. F.; CAMPOS, L. M. M. Development and validation of a RP-HPLC method for quantification of isoflavone aglycones in hydrolyzed soy dry extracts. **Journal of Chromatography B**, v. 836, p. 74-78, 2006.

CUNHA-FILHO, M. S.S.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; LANDÍN, M. Compatibility of the antitumoral  $\beta$ -lapachone with different solid dosage forms excipients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 590–598, 2007.

CURY, B.S.F.; SILVA JÚNIOR, N. P.; CASTRO, A.D. Influência das propriedades de granulados de celulose nas características físicas dos comprimidos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 37-44, 2008.

DARUHÁZI, A. E.; SZENTE, L.; BALOGH, B.; MÁTYUS, P.; BÉNI, S.; TAKÁCS, M.; GERGELY, A.; HORVÁTH, P.; SZÖKE, E.; LEMBERKOVICS, E. Utility of cyclodextrins in the formulation of genistein Part 1. Preparation and physicochemical properties of genistein complexes with native cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 636–640, 2008.

DESPAIGNE, D. A. N. Fitoestrógenos y su utilidad para el tratamiento del síndrome climatérico. **Revista Cubana Endocrinología**, v. 12, n. 2, p. 128-131, 2001.

DWIECKI, K.; NEUNERT, G.; POLEWSKI, P.; POLEWSKI, K. Antioxidant activity of daidzein, a natural antioxidant, and its spectroscopic properties in organic solvents

and phosphatidylcholine liposomes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, p. 242–248, 2009.

EMSHANOVA, S. E. Drug synthesis methods and production Technologies. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 42, n. 2, p. 38-43, 2008.

ESTEVEES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 1, p. 43-52, 2001.

FIP, Guidelines for Dissolution testing of solid oral products. **Drug Information Journal**, v. 30, p.1071 – 1084, 1996

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 86-93, 2001.

HODGES, N. Aplicações farmacêuticas de técnicas microbiológicas, In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Capítulo 40.

HOGAN, J. Revestimento de comprimidos e multiparticulados. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Capítulo 28.

HUANG, Z.-R.; HUNG, C.-F.; LIN, Y.-K.; FANG, J.-Y. *In vitro* and *in vivo* evaluation of topical delivery and potential dermal use of soy isoflavones genistein and daidzein. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 36–44, 2008.

ICH – Harmonised Tripartite Guidance. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B. In: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

KNIGHT, D. C.; EDEN, J. A. Phytoestrogens - a short review. **Maturitas**, v. 22, p. 167- 175, 1995.

KOROLKOVAS, A. Medicamentos e controle de sua qualidade. In: **Análise farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1984. Capítulo 1.

LAMOLHA, M. A.; SERRA, C. H. R.; COCKS, A. C. F. Avaliação das propriedades de fluxo dos granulados e dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida 50 mg obtidos por granulação úmida . **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.3, p. 435- 446, 2007.

LEE, S.-H. et al. Enhanced Bioavailability of Soy Isoflavones by Complexation with  $\beta$ -Cyclodextrin in Rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 71, n. 12, p. 2927-2933, 2007.

MANIASSO, N. Ambientes Micelares em Química Analítica. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MURA, P.; FAUCCI, M. T.; MANDERIOLI, A.; BRAMANTI, G.; CECCARELLI, L.

Compatibility study between ibuprofen and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, hot-stage microscopy and scanning electron microscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, p. 151–163, 1998.

MURA, P.; MANDEROLI, A.; BRAMANTI, G.; FURLANETTO, S.; PINZAUTI, S. Utilization of differential scanning calorimetry as a screening technique to determine the compatibility of ketoprofen with excipients. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 119, p. 71-79, 1995.

PALMA, S.; LUJAN, C.; LLABOT, J. M.; BARBOZA, G.; MANZO, R. H.; ALLEMANDI, D. A. Design of *Peumus boldus* tablets by direct compression using a novel dry plant extract. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, p. 191–198, 2002.

PARK, Y. K. et al. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 3, n. 003, p. 156-160, 2001.

PRABHAKARAN, M. P.; HUI, L. S.; PERERA, C. O. Evolution of the composition and concentration of isoflavones in soy based supplements, health products and infant formulas. **Food Research International**, v. 39, p. 730-738, 2006.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. M.; SILVA, M. A. S.; MATOS, J. R. Caracterização Termoanalítica e Estudo do Perfil de Dissolução de Comprimidos contendo Metronidazol. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 4, p. 528-34, 2008.

ROSTAGNO, M.A.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; MARTÍNEZ, J.A. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2–29, 2009.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Short-term stability of soy isoflavones extracts: Sample conservation aspects. **Food Chemistry**, v. 93, p. 557–564, 2005.

SCHNEIDER, L. C. R.; SINKA, I. C.; COCKS, A. C. F. Characterisation of the flow behaviour of pharmaceutical powders using a model die–shoe filling system. **Powder Technology**, v. 173, n.1, p. 59-71, 2007.

SHAO, Q.; ROWE, R.C.; YORK, P. Investigation of an artificial intelligence technology—Model trees Novel applications for an immediate release tablet formulation database. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 31, p. 137–144, 2007.

SINKA, I.C.; MOTAZEDIAN, F.; COCKS, A.C.F.; PITT, K.G. The effect of processing parameters on pharmaceutical tablet properties. **Powder Technology**,

v. 189, n. 2, p. 276-284, 2009.

STANIFORTH, J. Fluxo de pós, In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Capítulo 14.

STULZER, H. K.; SILVA, M. A. S. Desenvolvimento e Avaliação de Comprimidos de Captopril de Liberação Prolongada. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 2, p. 259-65, 2007.

SUMMERS, M; AULTON, M. Delineamento de formas farmacêuticas. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Capítulo 25.

TZANAVARAS, P. D.; THEMELIS, D. G.; ZOTOU, A.; STRATIS, J.; KARLBERG, B. Optimization and validation of a dissolution test for selegiline hydrochloride tablets by a novel rapid HPLC assay using a monolithic stationary phase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 670–675, 2008.

TAPIERO, H.; BA, G. N.; TEW, K.D. Estrogens and environmental estrogens. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 36-44, 2002.

USP 30/NF 25. United States Pharmacopeia & National Formulary. **Rockville: United States Pharmacopeial Convention**, 2007.

VENKATARAM, S.; KHOHLOKWANE, S.; LITKE, A.; LEPP, H. Tablet compression force measurement using strain gauges. **Pharmaceutics Acta Helvetiae**, v. 71, p. 329-334, 1996.

VIANA, O. S. et al. Desenvolvimento de formulações e tecnologia de obtenção de comprimidos revestidos de efavirez – terapia anti-HIV. **Revista brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.4, p. 505-511, 2006.

VILLANOVA, J.C.O; SÁ, V. R. Formas sólidas. In: **Excipientes: Guia prático para padronização – formas farmacêuticas orais sólidas e líquidas**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2009. Capítulo 2.

WELLS, J. Pré-formulação farmacêutica. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Capítulo 8.

WU, C.- Y.; SEVILLE, J. P. K. A comparative study of compaction properties of binary and bilayer tablets. **Powder Technology**, v. 189, p. 285–294, 2009.

WU, C.-Y.; HANCOCK, B.C.; MILLS, A.; BENTHAM, A.C.; BEST, S.M.; ELLIOTT, J.A. Numerical and experimental investigation of capping mechanisms during pharmaceutical tablet compaction. **Powder Technology**, v. 181, p. 121–129, 2008.

WU, Y. S.; VLIET, L. J.; FRIJLINK, H.W.; MAARSCHALK, K. V. Pore size distribution in tablets measured with a morphological sieve. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 342, p. 176–183, 2007.

YUAN, D.; PAN, Y.; CHEN, Y.; UNO, T.; ZHANG, S.; KANO, Y. An improved method for basic hydrolysis of isoflavone malonylglucosides and quality evaluation of chinese soy materials. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 1, p. 1–6, 2008.

YORK, P. Delineamento de formas farmacêuticas. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Capítulo 1.

ZHANG, Y.; LAW, Y.; CHAKRABARTI, S. Physical properties and compact analysis of commonly used direct compression binders. **AAPS PharmSciTech**, v. 4, n.1 , p.1-11, 2003. Artigo 62.

ZHAO, J.; BURT, H.M.; MILLER, R. A. The Gurnham equation in characterizing the compressibility of pharmaceutical materials. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 317, p. 109–113, 2006.