

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Investigação de Isoflavonas em Espécies
de Leguminosas Nativas do Sul do Brasil,
com Ênfase em *Trifolium riograndense* Burkart**

GREICE RAQUEL DETTENBORN

PORTO ALEGRE, 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Investigação de Isoflavonas em Espécies
de Leguminosas Nativas do Sul do Brasil,
com Ênfase em *Trifolium riograndense* Burkart**

Dissertação apresentada por **Greice Raquel
Dettenborn** para obtenção do título de Mestre
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi

Porto Alegre, 2009.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 18.06.2009, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Edna Sayuri Suyenaga
Centro Universitário Feevale

Profa. Dr. Silvia Teresinha Sfoggia Miotto
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Amélia Teresinha Henriques
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

D479i Dettenborn, Greice Raquel

Investigação de isoflavonas em espécies de leguminosas nativas do sul do Brasil, com ênfase em *Trifolium riograndense* Burkart / Greice Raquel Dettenborn – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xiv, 123p.: il ., gráf., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Farmacologia. 2. Leguminosae. 3. *Trifolium riograndense*. 4. Trevo. 5. Isoflavonas. I. Zuanazzi, José Angelo Silveira. II. Título.

CDU: 615.322:582.736

Bibliotecária responsável:

Claudia da Silva Gonçalves de Leon, CRB10/1012

AGRADECIMENTOS

Ao querido Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi, pela orientação, estímulo, amizade e ensinamentos inestimáveis.

Ao Prof. Dr. Miguel Dall'Agnol, pelo auxílio nas coletas e por dividir seus conhecimentos à respeito das leguminosas.

À Profa. Dra. Sílvia Teresinha Miotto, pela doação das amostras de Leguminosas nativas, pela identificação botânica de *Trifolium riograndense* e pelas demais contribuições na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Miriam Anders Apel, pelas colaborações nas análises biológicas e também pelo incentivo e amizade desde a época da graduação.

À Prof. Dra. Elfrides Schapoval pela parceria nas análises biológicas.

À Grazielle Pereira Ramos, em breve doutora, pelo coleguismo, por todos os ensinamentos e auxílios na realização deste trabalho, sendo um exemplo de pesquisadora para mim.

Às bolsistas de iniciação científica Cláudia Morais e Paula Ceolato, pelos grandes auxílios durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu marido, Richard, pela compreensão e apoio.

À minha irmã Mayara, pela amizade e pela força.

Em especial, ao meu pai João e à minha mãe Nice pela formação, pela oportunidade de estudar, pelo amor, suporte, incentivo e carinho.

RESUMO

Isoflavonas são compostos fenólicos de ocorrência principalmente na família Leguminosae, utilizados, entre outros, como alternativa para a reposição hormonal em mulheres no período pós-menopausa, devido a sua ação estrogênica seletiva. Em vista disso, foi investigada a presença das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A em 153 espécies de Leguminosae nativas do Rio Grande do Sul através de cromatografia líquida de alta eficiência. Destas, 42 espécies apresentaram ao menos uma das quatro isoflavonas investigadas. Pertencente à família Leguminosae, o gênero *Trifolium* é encontrado em quase toda a zona temperada e subtropical do mundo, sendo que a espécie *Trifolium riograndense* é nativa do estado do Rio Grande do Sul. As isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A foram quantificadas nesta espécie, que apresentou 0,187 mg de daidzeína; 0,223 mg de genisteína; 16,683 mg de formononetina e 1,207 mg de biochanina A (por grama de amostra seca). A parte da planta com maior concentração de isoflavonas foi a folha, com 7,331 mg por grama de amostra seca, e a parte da planta com menor teor destas isoflavonas foi a raiz, com 2,806 mg por grama de amostra seca. Formononetina foi a isoflavona majoritária em todas as partes da planta analisadas. Ainda, foram realizados ensaios de atividade antiinflamatória do extrato das folhas de *Trifolium riograndense*. Foram utilizados os modelos de quimiotaxia *in vitro* em câmara de Boyden e indução de edema em pata de ratos, utilizando a carragenina como agente flogístico. Pelo ensaio de quimiotaxia, verificou-se que o extrato das folhas do trevo em estudo apresentou inibição da migração leucocitária de forma significativa em diversas concentrações testadas. Através do ensaio de edema em pata de rato, verificou-se que a administração por via oral de extrato de *Trifolium riograndense* em ratos, na dose de 100 mg/kg, inibiu a formação do edema provocado pela carragenina, significativamente.

PALAVRAS-CHAVE: Leguminosae, *Trifolium riograndense*, trevo, isoflavonas.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ISOFLAVONES IN LEGUMINOUS NATIVES OF SOUTH BRAZIL, WITH EMPHASIS IN *TRIFOLIUM RIOGRANDENSE* BURKART

Isoflavones are polyphenolic compounds of Leguminosae Family. They are used as alternative therapy for treating symptoms of the menopause, due their selective action in oestrogenic receptors. So, the presence of isoflavones daidzein, genistein, formononetin and biochanin A was investigated in 153 species of the Leguminosae Family that are natives of South Brazil, by high performance liquid chromatography. Forty two species showed at least one of four investigated isoflavones. The genus *Trifolium* belongs to Leguminosae Family. It is found in temperate and subtropical regions in the world. *Trifolium riograndense* is a species native of Rio Grande do Sul – Brazil. The isoflavone content in this species was 0.187 mg g⁻¹ of dry material (DM) to daidzein; 0.223 mg g⁻¹ of DM to genistein; 16.683 mg g⁻¹ of DM to formononetin, and 1.207 mg g⁻¹ of DM to biochanin A. The leaf was the part of the plant with more isoflavone content, 7.331 mg of DM. The root was the part with less isoflavone content, 2.806 mg of DM. The majority isoflavone in all parts was formononetin. The dry extract of leaves of *Trifolium riograndense* was submitted to biological tests. The anti-inflammatory activity was analyzed by Boyden chamber assay, it allowed observe chemotaxis phenomenon, and by induced rat paw oedema using carrageenan as flogistic agent. Through chemotaxis model, potential activity could be observed to extract of *Trifolium riograndense*. In the induced rat paw oedema test, a significantly inhibition of oedema was observed in the animals treated with extract of *Trifolium riograndense* (100 mg/kg).

KEYWORDS: Leguminosae, *Trifolium riograndense*, isoflavones, clover

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Estrutura química de diferentes grupos de fitoestrógenos..... | 14 |
| Figura 2: Estrutura química das isoflavonas biochanina A, genisteína, daidzeína e formononetina, e do 17 β -estradiol..... | 15 |
| Figura 3: Representação esquemática da biossíntese dos isoflavonóides a partir de uma flavanona..... | 16 |
| Figura 4: Cromatograma e espectros no ultravioleta das isoflavonas de referência daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A..... | 36 |
| Figura 5: Cromatograma e espectros no ultravioleta das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A encontradas na espécie <i>Trifolium riograndense</i> | 40 |
| Figura 6: Dendograma das 42 espécies de Leguminosas que apresentaram as isoflavonas..... | 45 |
| Figura 7: Partes aéreas de <i>Trifolium riograndense</i> | 54 |
| Figura 8: Cromatograma da mistura padronizada das isoflavonas de referência daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A..... | 57 |
| Figura 9: Placas de acrílico utilizadas para o ensaio de quimiotaxia..... | 72 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Números de tribos, gêneros e espécies de leguminosas no mundo..... | 24 |
| Tabela 2: Números de tribos, gêneros e espécies de leguminosas no Rio Grande do Sul..... | 25 |
| Tabela 3: Sinopse das tribos e gêneros de Faboideae com espécies nativas, cultivadas ou adventícias ocorrentes no Sul do Brasil..... | 26 |
| Tabela 4: Espécies analisadas das tribos Swartzieae, Crotalariaeae, Genisteae, Millettieae e Trifolieae – Subfamília Faboideae..... | 29 |
| Tabela 5: Espécies analisadas das tribos Dalbergieae, Indigofereae e Desmodieae – Subfamília Faboideae..... | 30 |
| Tabela 6: Espécies analisadas das tribos Phaseoleae, Sesbanieae, Loteae e Fabeae – Subfamília Faboideae..... | 31 |
| Tabela 7: Espécies analisadas das tribos Cercideae, Detarieae, Cassieae e Caesalpinieae – Subfamília Caesalpinioideae..... | 32 |
| Tabela 8: Espécies analisadas das tribos Acacieae, Ingeae e Mimoseae – Subfamília Mimosoideae..... | 33 |
| Tabela 9: Parâmetros para análise cromatográfica de espécies de leguminosas..... | 34 |
| Tabela 10: Sistema gradiente utilizado para a análise por CLAE de espécies de leguminosas..... | 34 |
| Tabela 11: Presença/ausência das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A em espécies da tribo Genisteae..... | 38 |
| Tabela 12: Presença/ausência das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A em espécies da tribo Dalbergieae..... | 41 |
| Tabela 13: Presença/ausência das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A em espécies da tribo Desmodieae..... | 41 |
| Tabela 14: Presença/ausência das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A em espécies da tribo Phaseoleae..... | 42 |
| Tabela 15: Parâmetros para análise quantitativa de isoflavonas em <i>Trifolium riograndense</i> | 56 |
| Tabela 16: Sistema gradiente utilizado para a análise por CLAE de espécies de leguminosas..... | 57 |

| | |
|---|----|
| Tabela 17: Equações lineares e coeficientes de correlação das isoflavonas de referência..... | 58 |
| Tabela 18: Quantidades de cada isoflavona (mg/g de amostra seca) em cada órgão analisado de <i>Trifolium riograndense</i> | 60 |
| Tabela 19: Resposta quimiotáxica <i>in vitro</i> de neutrófilos tratados com as suspensões de extrato seco de <i>Trifolium riograndense</i> em diferentes concentrações e com as isoflavonas de referência..... | 77 |
| Tabela 20: Efeito da administração v.o. de <i>Trifolium riograndense</i> sobre o edema em pata de ratos induzido pela carragenina..... | 79 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| OBJETIVOS | 5 |
| CAPÍTULO I – REVISÃO SOBRE MENOPAUSA E FITOESTRÓGENOS..... | 9 |
| I.1 Climatério e Menopausa..... | 11 |
| I.2 Fitoestrógenos..... | 13 |
| CAPÍTULO II – INVESTIGAÇÃO DE ISOFLAVONAS EM ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS NATIVAS DA REGIÃO SUL | 21 |
| II.1.1 Subfamília Faboideae (Papilionoideae)..... | 25 |
| II.1.2 Subfamília Mimosoideae | 27 |
| II.1.3 Subfamília Caesalpinioideae | 28 |
| II.2 Materiais e Métodos | 29 |
| II.2.1 Material Vegetal..... | 29 |
| II.2.2 Métodos..... | 33 |
| II.3 Resultados e Discussão | 35 |
| CAPÍTULO III – DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ISOFLAVONAS EM <i>TRIFOLIUM RIOGRANDENSE</i> | 47 |
| III.1 Gênero <i>Trifolium</i> | 49 |
| III.1.1 Aspectos Morfológicos e de Cultivo..... | 49 |
| III.1.2 Fitoquímica | 50 |
| III.1.3 Farmacologia..... | 52 |
| III.2 <i>Trifolium riograndense</i> Burkart | 53 |
| III.3 Materiais e Métodos | 55 |
| III.3.1 Material Vegetal..... | 55 |
| III.3.2 Métodos..... | 55 |
| III.4 Resultados e Discussão | 57 |

| | |
|---|--------|
| CAPÍTULO IV – INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DO EXTRATO DE <i>TRIFOLIUM RIOGRANDENSE</i> | 65 |
| IV.1 Inflamação..... | 66 |
| IV.1.1 Processo Inflamatório..... | 67 |
| IV.1.2 Antiinflamatórios..... | 69 |
| IV.1.3 Atividade Antiinflamatória de Princípios Ativos de Plantas..... | 69 |
| IV.2 Métodos | 71 |
| IV.2.1 Preparo da Amostra | 71 |
| IV.2.2 Avaliação da Atividade Antiinflamatória pelo Método de Quimiotaxia <i>in vitro</i> ... | 72 |
| IV.2.3 Avaliação da Atividade Antiinflamatória pelo Método de Edema em Pata de Ratos . | 75 |
| IV.3 Resultados e Discussão..... | 76 |
| DISCUSSÃO GERAL | 81 |
| CONCLUSÕES | 87 |
| REFERÊNCIAS | 91 |

INTRODUÇÃO

O período pós-menopausa se caracteriza por diversos distúrbios (NAVARRO *et al.*, 2001), sendo a terapia de reposição hormonal recomendada para as mulheres neste estágio (HAN *et al.*, 2002). Porém, a reposição hormonal pode ocasionar inúmeros efeitos adversos, sobretudo quando utilizado por longo período. Sabe-se que as plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, dentre estes os fitoestrógenos, que poderiam ser alternativas terapêuticas neste período da vida da mulher, visto que estes compostos podem promover efeitos seletivos (WOLFF, 2005).

Os isoflavonóides são muito utilizados como fitoestrógenos. São caracterizados, como os demais flavonóides, por uma cadeia arila-C3-arila, mas do tipo difenil-1,2-propano. As isoflavonas têm recebido muita atenção atualmente devido aos seus efeitos benéficos à saúde humana. Estudos demonstram que estes compostos são úteis na prevenção e tratamento de câncer, perda óssea e sintomas associados à menopausa, e também podem reduzir os teores de colesterol (SIVESIND & SEGUIN, 2005).

Ao contrário das outras classes de flavonóides, a distribuição taxonômica de isoflavonas é restrita. Salvo raríssimas exceções, são de ocorrência exclusiva na Família Leguminosae (ZUANAZZI & MONTANHA, 2003). Esta é uma das maiores famílias dentre as dicotiledôneas, possuindo mais de 600 gêneros que reúnem cerca de 13.000 espécies, espalhadas em todo mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (JOLY, 1993).

A maior parte dos estudos sobre isoflavonas estão focados no grão de soja (*Glycine max*), que contém dois tipos de isoflavonas em grandes quantidades (genisteína e daidzeína). No entanto, o grão de soja possui de 2 a 10 vezes menor teor de isoflavonas que o trevo-vermelho (*Trifolium pratense*). Extratos de isoflavonas (genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A) e cumestanos (cumestrol) derivados da soja e do trevo-vermelho são, em muitos países, um dos medicamentos de venda livre mais comercializados (WUTTKE *et al.*, 2003).

A comprovação da atividade estrogênica e de outras diversas propriedades biológicas das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A

(USUI, 2006) torna a análise da presença destes compostos em espécies de leguminosas muito importante, tendo como objetivo a descoberta de novas fontes destas isoflavonas.

Têm crescido o interesse por uma classificação mais natural das plantas, considerando também a composição química, ocasionando um redimensionamento da classificação taxonômica existente. O estudo fitoquímico, associado com a correta classificação botânica do táxon, pode representar uma ferramenta interessante, contribuindo significativamente na obtenção de novas moléculas ativas (HEGNAUER, 1986). Diante disso, considera-se relevante a possibilidade da utilização das isoflavonas como marcadores quimiosistemáticos para a família Leguminosae.

A espécie *Trifolium riograndense* Burkart é uma importante leguminosa, nativa do Rio Grande do Sul, tendo como principal característica a fixação de nitrogênio do solo, o que melhora a qualidade das pastagens. Tendo em vista a busca por novas espécies de interesse à farmacologia moderna, considera-se relevante o estudo desta espécie, visando à identificação e quantificação das isoflavonas presentes e a determinação da atividade antiinflamatória desta espécie, visto que não há na literatura científica nenhum estudo químico e de atividades biológicas desta planta até o presente momento.

OBJETIVOS

A presente dissertação tem por objetivo investigar a presença de isoflavonas em espécies de Leguminosas nativas da região sul do Brasil, bem como investigar os teores de isoflavonas nas diferentes partes da espécie *Trifolium riograndense*. Além disso, objetiva-se investigar a atividade antiinflamatória do extrato de *Trifolium riograndense*.

Objetivos Específicos

Verificar a presença das isoflavonas (genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A) por CLAE em extratos de folhas de 153 espécies de leguminosas nativas da Região Sul do Brasil.

Identificar e quantificar as isoflavonas nas diferentes partes de *Trifolium riograndense*.

Determinar a atividade antiinflamatória do extrato seco das folhas de *Trifolium riograndense* pelo método de inibição da quimiotaxia *in vitro*, através do modelo de câmara de Boyden.

Investigar a atividade antiinflamatória do extrato seco das folhas de *Trifolium riograndense* pelo método de edema em pata de rato.

CAPÍTULO I – REVISÃO SOBRE MENOPAUSA E FITOESTRÓGENOS

I.1 Climatério e Menopausa

Como marco biológico, o climatério representa a transição entre a fase reprodutiva e a não reprodutiva, ou seja, do menacne para a senilidade, com conseqüências sistêmicas e potencialmente patológicas (BOSSEMEYER, 1999).

O climatério é um fenômeno fisiológico decorrente do esgotamento dos folículos ovarianos que ocorre em todas as mulheres de meia idade, seguido da queda progressiva da secreção de estradiol, culminando com a interrupção definitiva dos ciclos menstruais (menopausa) e o surgimento de sintomas característicos (ALDRIGHI *et al.*, 2002).

A menopausa, definida clinicamente como último fluxo menstrual, é um evento natural que ocorre em mulheres com idade em torno dos cinqüenta anos, decorrente da falência gonadal e caracterizada por deficiência de hormônios esteróides (NAVARRO *et al.*, 2001). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1996), a menopausa natural é definida por 12 meses consecutivos de amenorréia, sem outra causa patológica ou psicológica evidente, não existindo nenhum indicador biológico independente e adequado para caracterizá-la.

A falência ovariana observada no período do climatério determina um estado hipoestrogênico, podendo ocasionar diversos distúrbios, como sintomas vasomotores, osteoporose e alterações urogenitais. Ainda, dificuldades cognitivas, instabilidade emocional e humor depressivo têm sido igualmente relacionados ao climatério (DE LORENZI *et al.*, 2005). Conforme MEDEIROS e colaboradores (2006), as principais manifestações clínicas do climatério são sintomas vasomotores, nervosismo, diminuição da memória e fadiga, e acometem cerca de 60% das mulheres nesta fase. A atrofia urogenital e a osteoporose surgem após alguns anos.

Em relação aos sintomas vasomotores, as ondas de calor são o sintoma mais freqüente em mulheres climatéricas. Caracterizam-se por uma sensação transitória e súbita de aumento da temperatura corporal, freqüentemente acompanhada de sudorese, palpitações e cefaléia, que acaba por interferir nas atividades diárias e na qualidade do sono podendo ter impacto negativo na qualidade de vida. O

mecanismo fisiopatológico das ondas de calor ainda não é totalmente conhecido, porém, sabe-se que o declínio dos níveis de estradiol interfere no centro regulador da temperatura localizado no hipotálamo, favorecendo a sua ocorrência (ALDRIGHI *et al.*, 2002, DE LORENZI *et al.*, 2005)

A deficiência estrogênica causada pela menopausa é também um dos principais fatores de risco para osteoporose em mulheres. Os estrogênios, por sua ação anti-reabsortiva, atuam prevenindo a perda de massa óssea, diminuindo o risco de fraturas. Na menopausa, diminui-se a formação óssea em cada unidade de remodelação, o que conduz a uma perda de massa óssea. Dentre os fatores de risco está a ausência de atividade física regular e de terapia de reposição hormonal, bem como fatores genéticos e relativos à dieta (HALLBERG *et al.*, 1992). Acredita-se que, após a menopausa, as mulheres perdem de 2% a 3% de sua massa de osso cortical por ano (LUCASIN JUNIOR & LIMA, 1994).

O hipoestrogenismo é responsável por várias manifestações urogenitais na mulher menopausada: ressecamento vaginal, dispareunia, prurido vulvar, leucorréia, dificuldades de esvaziamento vesical, urgência e aumento da frequência miccional, noctúria, disúria e incontinência urinária. Vários elementos são responsáveis pela continência urinária, incluindo aqueles dependentes de estrogênio, em particular o tônus e o trofismo do assoalho pélvico e da mucosa uretral. Também existem receptores de estrógeno e de progesterona no trato urinário inferior e assoalho pélvico nos ligamentos e nas fâscias musculares que compõem o diafragma pélvico e urogenital da mulher (PARDINI, 2007).

Na esfera cognitivo-comportamental, no climatério, não são raras mudanças comportamentais, maior labilidade emocional e até dificuldades com a memória (DE LORENZI *et al.*, 2005). As evidências que sustentam a hipótese de que a deficiência estrogênica seja uma das causas de demência senil é oriunda da associação positiva entre o estrógeno exógeno e a performance cognitiva em mulheres idosas sem demência. Os efeitos protetores do estrógeno no cérebro incluem aumento da atividade colinérgica, redução da perda neuronal e estimulação axonal, proliferação de formações dendríticas, redução da isquemia cerebral por aumento da circulação

e redução dos níveis de colesterol e modulação da expressão gênica da apolipoproteína E (SCHUMAKER *et al.*, 2003).

Ainda, níveis baixos de estrogênio, observados em mulheres após a menopausa, têm mostrado atenuar a resposta imune e predispor o organismo à invasão microbiana e infecção (OLSEN & KOVACS, 1996; MEDEIROS *et al.*, 2003). Um estudo de corte transversal relatou diminuição nos números de linfócitos CD4, linfócitos B e atividade citotóxica das células NK em mulheres após a menopausa (GIGLIO *et al.*, 1994).

Com o objetivo de proporcionar alívio dos sintomas citados, a utilização de estrogênio e progesterona (reposição hormonal) tornou-se bastante difundida nas últimas décadas (OPPERMANN-LISBOA & WANNMACHER, 2001). Entretanto, a partir de 2002, a publicação dos resultados dos estudos conhecidos por WHI (*Women's Health Initiative*), houve uma sensível redução na sua prescrição. Os achados do estudo WHI apontaram para um risco significativo maior para eventos tromboembólicos e câncer de mama, respectivamente, no final do primeiro e após o quinto ano do uso contínuo de estrógenos conjugados eqüinos associados a acetato de medroxiprogesterona, quando comparado com um grupo controle sem qualquer medicação hormonal (DE LORENZI & BARACAT, 2005). Além disso, a terapia com estrogênios pode ocasionar outros efeitos adversos e prejudiciais como mastalgias e sangramentos uterinos irregulares.

A partir destas observações, verifica-se um aumento da não aceitação do tratamento hormonal. Nestes casos, têm-se procurado utilizar medicamentos alternativos no sentido de promover alívio dos sintomas climatéricos, como, por exemplo, os fitoestrógenos.

I.2 Fitoestrógenos

Fitoestrógenos são definidos como substâncias não-esteróides obtidas de plantas que são estruturalmente ou funcionalmente similares ao estradiol (KNIGHT & ÉDEN, 1996). Exemplos destas estruturas estão apresentados na Figura 1.

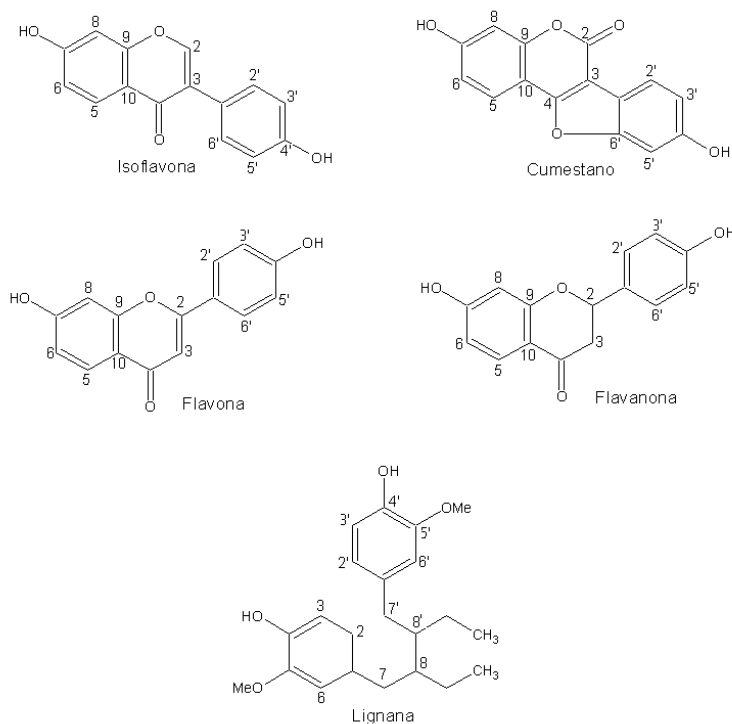


Figura 1: Estrutura química de diferentes grupos de fitoestrógenos

Os fitoestrógenos são usados há muitos anos, por várias culturas. Pesquisas epidemiológicas indicam que a incidência de doenças hormônio-dependentes é reduzida em países com uma dieta contendo fitoestrógenos. Ultimamente, observa-se um aumento no interesse pelo uso de fitoestrógenos, pois estes interagem com o receptor estrogênico, induzindo efeitos agonistas em determinados tecidos e antagonistas em outros, promovendo um potencial efeito preventivo, além de proporcionar uma segurança oncológica com o uso prolongado de fitoestrógenos, os tornando consideravelmente interessantes (TEMPFER *et al.*, 2007).

Para exercerem atividade estrogênica, os fitoestrógenos devem apresentar alguns aspectos estruturais. O núcleo da estrutura dos flavonóides com grupos 2,4-hidroxila em certas posições é fundamental para a estrogenicidade. A metilação dos grupos hidroxila diminui o efeito estrogênico (ZAND *et al.*, 2000; BECK *et al.*, 2005).

As isoflavonas, encontradas no trevo-vermelho (*Trifolium pratense*) e na soja (*Glycine max*), são os compostos fitoestrogênicos mais extensamente estudados, sendo que existem mais de 350 isoflavonas conhecidas até o momento.

I.2.1 Isoflavonas

I.2.1.1 Estrutura e biossíntese

As isoflavonas são compostos difenólicos pertencentes a uma subfamília dos flavonóides. As quatro isoflavonas mais comuns associadas com ervas ou extratos são daizeína, genisteína, formononetina e biochanina A. A estrutura química das isoflavonas assemelha-se à do 17 β -estradiol (Figura 2).

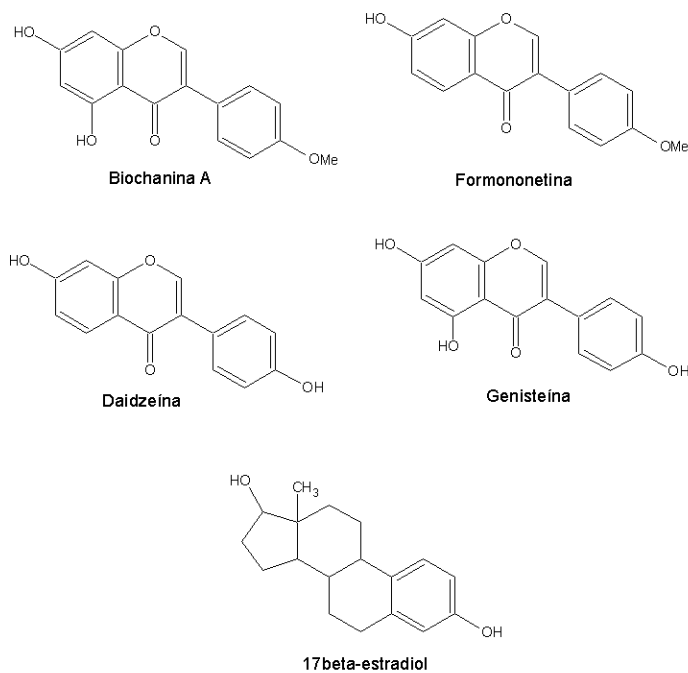


Figura 2: Estrutura química das isoflavonas biochanina A, genisteína, daidzeína e formononetina, e do 17 β -estradiol.

As isoflavonas são formadas por uma ramificação da rota biossintética dos flavonóides, originários de uma flavanona intermediária central que é ubiquamente presente em plantas (Figura 3). Na biossíntese dos isoflavonóides, primeiramente a

flavanona perde o hidrogênio da posição C-3, seguido de uma migração do anel B de C-2 para C-3 e subsequente hidroxilação da posição C-2. Essa reação requer NADPH e oxigênio molecular e é catalisada pela enzima isoflavona sintetase que consiste de 2-hidroxiisoflavona sintase (2-HIS) e 2-hidroxiisoflavonona desidratase (DIXON & STEELE, 1999). Acredita-se que todas isoflavonas são derivadas de um restrito número de isoflavonas simples, como por exemplo, daidzeína e genisteína (TAHARA & IBRAHIM, 1995).

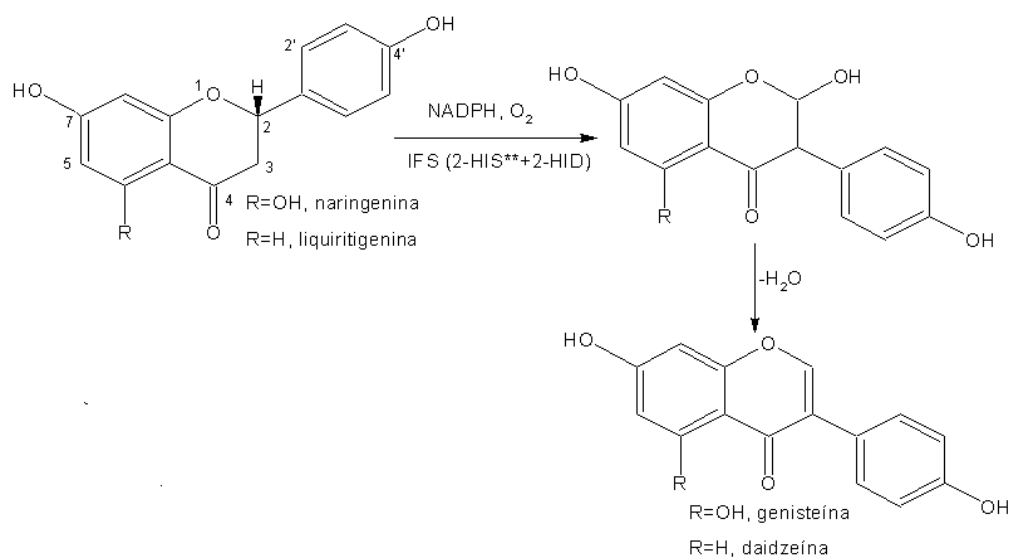


Figura 3: Representação esquemática da biossíntese dos isoflavonóides a partir de uma flavanona. Enzima IFS: isoflavona sintetase (consiste em 2-HIS, 2-hidroxiisoflavona sintase; 2-HID, 2-hidroxiisoflavonona desidratase). **hidroxilase do citocromo P₄₅₀.

A diversidade estrutural dos isoflavonóides de ocorrência natural é dependente de: a) modificações no núcleo cíclico fundamental; b) oxigenação dos carbonos aromáticos; c) C- ou O- alquilação, C- ou O- metilação e C- ou O- isopentilação (prenilação ou geranilação); e d) a modificação dos substituintes, oxigenação dos locais de ligação e ciclização com grupamento hidroxil fenólico produzindo um anel metilenodioxí, bem com uma grande variedade em éteres cíclicos com 5- e 6- membros oxidados (TAHARA & IBRAHIM, 1995).

Nos vegetais, as isoflavonas apresentam-se biologicamente inativas, ligadas a uma molécula de açúcar, sob as formas de malonil e β -glicosídeo, principalmente na posição C-7 (REINLI & BLOCK, 1996).

Os malonatos têm interesse biológico para as plantas pelo fato destas formas conjugadas serem utilizadas para armazenar agliconas de isoflavonas, que são a forma ativa, na forma menos solúvel e, assim, a planta libera as agliconas dos malonatos apenas quando infectada por um microrganismo (SUMNER *et al.*, 1996).

I.2.1.2 Efeitos no organismo

Após a ingestão, as formas conjugadas das isoflavonas são hidrolisadas pelas β -glucosidases de bactérias intestinais, liberando as principais agliconas. Essas podem ser absorvidas e/ou metabolizadas por bactérias intestinais e produzir metabólitos específicos, tais como equol (SETCHELL, 2000). O metabolismo intestinal é essencial para a absorção e a biodisponibilidade das isoflavonas (REN *et al.*, 2001).

As isoflavonas se ligam com maior afinidade aos receptores estrogênicos do tipo β (ER β), enquanto os estrógenos apresentam maior afinidade pelos receptores ER α . A maior afinidade ao receptor ER β sugere que as isoflavonas possam exercer efeitos seletivos (estrogênico e antiestrogênico), dependendo do tecido e da concentração. Essas substâncias ligam-se aos receptores estrogênicos distribuídos principalmente nos ossos, cérebro, endotélio vascular e bexiga (PAECH *et al.*, 1997). Já o estradiol de mamíferos tem maior afinidade por receptores estrogênicos ER α , presentes no tecido mamário e uterino (KUIPER *et al.*, 1998).

Nas mulheres, na fase pós-menopausa ocorre uma diminuição da concentração do estrogênio endógeno e os receptores estrogênicos ficam mais disponíveis, favorecendo a ação estrogênica das isoflavonas, que acabam compensando a deficiência do hormônio humano. Assim, além de proporcionarem melhoria dos sintomas da menopausa, elas mantêm ação estrogênica positiva no metabolismo ósseo, no sistema nervoso central e no sistema cardiovascular (SETCHELL, 1998; LEPHART *et al.*, 2002).

Conforme BRANDI (1997), os mecanismos pelos quais as isoflavonas exercem efeitos benéficos em diversos processos bioquímicos e fisiológicos estão relacionados, em parte, com sua habilidade de ligar-se em receptores estrogênicos.

Outros mecanismos hipotéticos derivam das suas propriedades bioquímicas, tais como inibição da atividade enzimática e efeito antioxidante.

Estudos mostram que as agliconas de isoflavonas podem ser acentuadamente ativas contra tumores de mama e próstata. Muito embora os mecanismos pelos quais as isoflavonas inibam a carcinogênese não sejam claramente conhecidos (SHERTZER *et al.*, 1999), seus efeitos citotóxicos podem estar relacionados à inibição de enzimas envolvidas em processos de carcinogênese, como a topoisomerase II e a tirosina quinase (SKIBOLA & SMITH, 2000). As isoflavonas ainda interferem na ação da DNA-topoisomerase II, S6-quinase ribossomal, fosfoinositídeo 3-quinase e proteína quinase C, enzimas ligadas ao ciclo, diferenciação e proliferação celulares (GAMET-PAYRASTRE *et al.*, 1999).

Estudos usando roedores ovariectomizados têm mostrado que as isoflavonas reduzem a perda de massa óssea que ocorre após a ovariectomia (ARJMANDI *et al.*, 1998). Similarmente, ensaios em humanos têm registrado que as isoflavonas atenuam a perda óssea que ocorre durante e depois da menopausa (MORABITO *et al.*, 2002). Em geral, tanto evidências epidemiológicas como clínicas apontam para uma relação positiva entre o consumo de isoflavonas e a densidade mineral óssea.

Um estudo recente realizado com homens e mulheres saudáveis mostrou redução dos níveis de colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL) provocada pela presença na dieta de 25 g de proteína isolada de soja por dia, sendo o efeito proporcional ao seu conteúdo de isoflavonas (CROUSE *et al.*, 1999).

Em relação à atividade sobre o sistema imunológico, WANG e colaboradores (1997) demonstraram *in vitro* que a daidzeína aumentou a ativação de linfócitos em camundongos. Para ZHANG e colaboradores (1999) as isoflavonas são capazes de ativar células *natural killer* (NK) e aumentar as defesas imunológicas contra o câncer. WATANABE e colaboradores (2000) sugeriram que o aumento de células NK pode ser devido à influência das isoflavonas sobre o sistema imune. Em seus estudos preliminares, a atividade das células NK mostrou-se aumentada em 13%.

Em relação à inflamação, a genisteína causou uma supressão na resposta inflamatória mediada por células (VERDRENGH *et al.*, 2003), pois inibiu a aderência de monócitos às células endoteliais (CHACKO *et al.*, 2005). Evidências indicaram que isoflavonas possuem uma atividade Fator-Kappa B Nuclear (NF- κ B) inibitória e/ou efeitos inibitórios nos alvos da inflamação/cascata apoptótica. Mais especificamente, os efeitos das isoflavonas em inflamação NF- κ B-dependente têm sido observados em asma, artrite e problemas nos pulmões (DIJSSELBLOEM *et al.*, 2004).

Em muitos países, produtos à base de isoflavonas são considerados suplementos alimentares. No entanto, a legislação brasileira de alimentos não permite as designações "suplemento alimentar", "suplemento nutricional", "complemento alimentar" ou "complemento nutricional". Os produtos ricos em isoflavonas encontrados no comércio, não podem ser considerados alimentícios por apresentarem alegações medicamentosas ou terapêuticas. Desta forma, esses produtos são considerados irregulares pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) na área de alimentos. Além de sua irregularidade, não há uma padronização das fontes de isoflavonas nem controle sobre os teores de isoflavonas e sua variação para a maioria dos produtos encontrados no comércio.

Existem vários produtos com isoflavonas registrados na ANVISA como medicamentos fitoterápicos, sendo que são indicados apenas para alívio das ondas de calor associadas à menopausa e como auxiliar na redução dos níveis de colesterol. Como exemplo, temos os extratos padronizados de *Glycine max* (Buona[®], Fitosoy[®], Soyfemme[®]) e de *Trifolium pratense* (Climadil[®]).

**CAPÍTULO II – INVESTIGAÇÃO DE ISOFLAVONAS EM ESPÉCIES DE
LEGUMINOSAS NATIVAS DA REGIÃO SUL**

II.1 Família Leguminosae

A família Leguminosae, também conhecida como Fabaceae, está presente no planeta há aproximadamente 120 milhões de anos como uma família numerosa de árvores, arbustos, ervas, com grande variabilidade em seu porte e hábitos. É uma das maiores famílias dentre as dicotiledôneas, possuindo em torno de 700 gêneros que reúnem cerca de 17.000 espécies, espalhadas em todo mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (LEWIS *et al.*, 2005).

Do ponto de vista filogenético, a África foi o primeiro sítio de evolução. De lá, as espécies dessa família se dispersaram pela América do Sul e Ásia, este último com menos representações. Na América do Norte e na Europa há menor quantidade de gêneros e espécies, principalmente devido ao isolamento destas regiões em relação ao centro de divergência africano (IZAGUIRRE & BEYHAUT, 2003). As únicas regiões do mundo sem representação de espécies de Leguminosae são as regiões árticas e antárticas (BURKART, 1987).

Muitas leguminosae são úteis e cultivadas desde a antiguidade como fontes de alimentos (lentilha, grão-de-bico, feijão, ervilha, fava, soja), como forrageiras (alfafa, trevos), como adubo verde (tremoços), como oleaginosas (soja, amendoim), como tintóreas (índigo, pau-brasil), além de muito utilizadas como têxteis, inseticidas, melíferas, medicinais, ornamentais, entre outras (BURKART, 1987).

As leguminosae vivem, em sua maioria, em simbiose com bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Estes microorganismos específicos invadem as raízes jovens das leguminosae, provocando o desenvolvimento de nódulos. A planta fornece açúcares e outras substâncias nutritivas às bactérias e estas elaboram proteínas, a partir do nitrogênio molecular (N₂) atmosférico, existente no solo (ZUANAZZI *et al.*, 1998).

Em função disso, as leguminosae não necessitam dos nitratos dissolvidos no solo que, de outra maneira, seriam sua única fonte de nitrogênio. Em consequência disto, podem viver em terrenos muito pobres em nitratos. Ao mesmo tempo, os enriquecem com seus resíduos (folhagens e raízes), que se decompõem por ação

microbiana (amonização e nitrificação), originando nitratos a partir das proteínas. Muitas leguminosas agrícolas como a alfafa, o feijão, e os trevos não só são cultivados pelo benefício direto de seus produtos, mas também porque melhoram o solo. Este fato é o fundamento das rotações de culturas, em que se intercala, periodicamente, uma leguminosa entre os outros cultivos, para manter ou aumentar o rendimento (BURKART, 1987).

Várias leguminosas são tóxicas pela presença de princípios ativos nocivos, tanto para o homem, como para o gado, como é o caso de espécies *Astragalus* e *Lupinus*. Algumas são prejudiciais por seus acúleos (maricá, unha-de-gato), outras prejudicam a lã das ovelhas por seus frutos pegajosos (pega-pegas) ou gloquidiados (trevos-de-carretilha).

Muitas tentativas têm sido propostas para uma classificação quimiosistemática na família Leguminosae. Entre os marcadores de baixo peso molecular da subfamília Faboideae, estão os flavonóides, isoflavonóides, alcalóides quinolizidínicos e aminoácidos não-protéicos, os quais têm sido usados, gerando resultados comparáveis aos obtidos por dados morfológicos (GOMES *et al.*, 1981).

Três subgrupos são geralmente reconhecidos dentro de Leguminosae: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (Papilionoideae). Na maioria das classificações (POLHILL & RAVEN, 1981; LEWIS *et al.*, 2005) estes são considerados subfamílias. Porém, alguns autores os tratam como famílias independentes (HUTCHINSON, 1964; CRONQUIST, 1988). Na Tabela 1, está descrita a distribuição das leguminosas, de acordo com LEWIS e colaboradores (2005).

Tabela 1: Números de tribos, gêneros e espécies de leguminosas no mundo

| SUBFAMÍLIAS | Nº DE TRIBOS | Nº DE GÊNEROS | Nº DE ESPÉCIES |
|------------------|--------------|---------------|----------------|
| Faboideae | 28 | 478 | 13.800 |
| Mimosoideae | 04 | 78 | 3.270 |
| Caesalpinioideae | 04 | 171 | 2.250 |
| TOTAL | 36 | 727 | 19.320 |

No Rio Grande do Sul, ocorrem cerca de 300 espécies nativas, distribuídas de acordo com a Tabela 2, conforme MIOTTO (comunicação pessoal).

Tabela 2: Números de tribos, gêneros e espécies de leguminosas no Rio Grande do Sul

| SUBFAMÍLIAS | Nº DE TRIBOS | Nº DE GÊNEROS | Nº DE ESPÉCIES |
|------------------|--------------|---------------|----------------|
| Faboideae | 14 | 44 | 176 |
| Mimosoideae | 03 | 13 | 95 |
| Caesalpinioideae | 04 | 13 | 28 |
| TOTAL | 21 | 110 | 300 |

II.1.1 Subfamília Faboideae (Papilionoideae)

A subfamília Faboideae, também conhecida como Papilionoideae, é a mais extensa das três em que se divide a família Leguminosae. No mundo, com uma distribuição ampla e enorme diversidade de formas e tamanhos, esta subfamília compreende mais de 12.000 espécies (LEWIS *et al.*, 2005). Os gêneros lenhosos, mais primitivos, ocorrem principalmente no hemisfério sul e nos trópicos, e os gêneros herbáceos, mais evoluídos, ocorrem nas regiões temperadas e temperado-cálidas (HUTCHINSON, 1964).

Conforme IZAGUIRRE e BEYHAUT (1999), esta subfamília é de importância especial, principalmente devido ao fato de que as sementes e os legumes de muitas espécies herbáceas são alimentos essenciais ao homem e ao gado. Além disso, muitas das espécies são de importância fundamental na economia humana. Por sua riqueza em proteínas, são de grande valor, assim como também por seu conteúdo mineral. Algumas espécies dos gêneros *Medicago*, *Adesmia*, *Vicia*, entre outras, podem ser usadas como forrageiras, aumentando assim a proporção de nitrogênio no solo.

Entre as características botânicas, destacam-se: flores vistosas, papilionadas e hermafroditas; folhas pinadas, digitadas, trifoliadas, unifolioladas a simples, nunca bipinadas (IZAGUIRRE & BEYHAUT, 1999). O fruto é, em geral, legume ou

transformações deste, deiscente por uma ou duas fendas longitudinais ou indeiscente, algumas vezes alado, outras vezes separando-se em artículos unisseminados. As sementes são sem ou com muito pouco endosperma, algumas vezes estrofioladas, embrião freqüentemente encurvado (POLHILL, 1981).

Esta subfamília apresenta 14 tribos, com variedade de representações entre elas. Na tabela a seguir, estão descritas as tribos e gêneros de ocorrência no sul do Brasil.

Tabela 3: Sinopse das tribos e gêneros de Faboideae com espécies nativas, cultivadas ou adventícias ocorrentes no Sul do Brasil (MIOTTO, comunicação pessoal)

| TRIBOS | GÊNEROS |
|----------------|--|
| SWARTZIEAE | <i>Ateleia, Holocalyx, Swartzia, Zollernia</i> |
| SOPHOREAE | <i>Myrocarpus, Ormosia</i> |
| BRONGNIARTIEAE | <i>Poecilanthe,</i> |
| CROTALARIEAE | <i>Crotalaria, *Lotononis</i> |
| GENISTEAE | <i>Lupinus, Sellocharis, *Spartium, *Ulex</i> |
| DALBERGIEAE | <i>Adesmia, Aeschynomene, Arachis, Chaetocalyx, Dalbergia, Discolobium, Machaerium, Poiretia, Stylosanthes, *Tipuana, Zornia</i> |
| INDIGOFEREAE | <i>Indigofera</i> |
| MILLETIEAE | <i>Dahlstedtia, Lonchocarpus, Tephrosia, *Wisteria</i> |
| PHASEOLEAE | <i>*Cajanus, Calopogonium, Camptosema, Canavalia, Centrosema, Clitoria, Collaea, Dioclea, Eriosema, Erythrina, *Glycine, Galactia, *Lablab, Macroptilium, Mucuna, *Neonotonia, *Phaseolus, Rhynchosia, Vigna</i> |
| DESMODIEAE | <i>Desmodium</i> |
| SESBANIEAE | <i>Sesbania</i> |
| LOTEAE | <i>*Lotus, Ornithopus</i> |
| TRIFOLIEAE | <i>*Medicago, *Melilotus, Trifolium</i> |
| FABEAE | <i>Lathyrus, *Lens, *Pisum, Vicia</i> |

* Gêneros com espécies cultivadas e/ou adventícias.

II.1.2 Subfamília Mimosoideae

A subfamília Mimosoideae se distribui principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Contém mais de 50 gêneros. As espécies conhecidas integram os três maiores gêneros: *Acacia*, com aproximadamente 1.200 espécies; *Mimosa*, com mais de 400 espécies; e *Inga*, com mais de 350.

Quanto ao uso, as espécies da subfamília Mimosoideae possuem uma diversidade de uso menor quando comparada com a subfamília Papilionoideae. Algumas espécies de Mimosoideae fornecem madeira, como, por exemplo, as do gênero *Prosopis*. Outras fornecem taninos, como várias espécies de *Acacia*. Do ponto de vista ornamental, se destacam *Acacia caven*, *Enterolobium contortisiliquum*, algumas espécies de *Calliandra* e variadas espécies de *Mimosa*. São pouco utilizadas como plantas forrageiras e como alimento para o homem (IZAGUIRRE & BEYHAUT, 2003).

Segundo FARIA e colaboradores (1994), 90% das espécies de Mimosoideae examinadas em seu trabalho apresentaram ocorrência de nodulação produzida por simbiose bacteriana para fixação de nitrogênio.

Dentre as principais características botânicas, as espécies pertencentes à subfamília Mimosoideae apresentam-se geralmente lenhosas, raramente herbáceas. As flores são actinomorfas ou regulares, as pétalas valvares e as folhas geralmente são biparipinadas (IZAGUIRRE & BEYHAUT, 2003).

Esta subfamília se subdivide em quatro tribos: Acacieae, Ingeae, Mimoseae e Parkieae. Destas, apenas a última não está presente na região sul do Brasil. A tribo Acacieae apresenta apenas o gênero *Acacia*, com seis espécies nativas conhecidas. A tribo Ingeae conta com os seguintes gêneros nativos: *Inga*, *Albizia*, *Enterolobium* e *Calliandra*. Já a tribo Mimoseae conta com os gêneros *Desmanthus*, *Prosopis*, *Parapiptadenia*, *Mimosa* e *Neptunia*, com espécies nativas no sul do Brasil (IZAGUIRRE & BEYHAUT, 2003).

II.1.3 Subfamília Caesalpinioideae

A subfamília Caesalpinioideae apresenta espécies em sua maioria lenhosas, prevalecendo os tipos arbustivos e as árvores. Seus usos, ainda que limitados, não deixam de ser importantes. Em geral, são valorizadas como plantas ornamentais. Além disso, muitas espécies de *Cassia* são fontes de laxantes, enquanto que o pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) fornece uma madeira vermelha brilhante.

As características principais desta subfamília, que a diferenciam claramente das demais, são: uma redução na complexidade das folhas; a presença de hábitos mirmecófilos (alentam a presença de formigas para afugentar predadores); a inserção dos verticilos florais em cálices de diversas formas; a zigomorfia; a constituição do androceu, às vezes com presença de estaminódios, e auréolas nas sementes. Em geral, as espécies arbóreas desta subfamília não apresentam nódulos, produtos da simbiose bacteriana para fixação de nitrogênio (IZAGUIRRE & BEYHAUT, 2003).

Esta subfamília, em comparação com as outras duas, é a mais pobremente entendida em termos taxonômicos e filogenéticos. Compreende aproximadamente 170 gêneros. POLHILL & RAVEN (1981) dividiram a subfamília em 5 tribos: Cercideae, Caesalpinieae, Cassieae, Amheristeeae e Detarieae. Como resultado de análises filogenéticas, BRUNEAU e colaboradores (2001) listaram apenas 4 tribos: Cassieae, Detarieae, Caesalpinieae e Cercideae como componentes da subfamília Caesalpinioideae. Apesar de recentes análises de caracteres morfológicos e moleculares, as delimitações e relações entre estas tribos são problemáticas e controversas (LEWIS *et al.*, 2005).

Os principais gêneros da subfamília Caesalpinioideae com representações nativas na região sul do Brasil são: *Bauhinia*, tribo Cercideae; *Copaifera*, tribo Detarieae; *Apuleia*, *Cassia*, *Chamaecrista* e *Senna*, tribo Cassieae; e *Caesalpinia*, tribo Caesalpinieae (IZAGUIRRE & BEYHAUT, 2003).

II.2 Materiais e Métodos

II.2.1 Material Vegetal

Partes aéreas de 153 espécies de Leguminosas nativas coletadas em diversas regiões fisiográficas da região sul do Brasil, identificadas e fornecidas pela botânica Sílvia Teresinha Sfoggia Miotto, foram investigadas quanto à presença das isoflavonas genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A.

Nas tabelas abaixo (Tabelas 4 a 8), estão descritas as espécies investigadas e o número de registro das exsicatas no Herbário ICN da UFRGS.

Tabela 4: Espécies analisadas das tribos Swartzieae, Crotalariaeae, Genisteae, Millettieae e Trifolieae – Subfamília Faboideae

| SUBFAMÍLIA | TRIBO | ESPÉCIE | VOUCHER |
|--------------------------------|-------------------------------------|--|------------|
| Faboideae | Swartzieae | <i>Ateleia glazioviana</i> Baill | ICN 118603 |
| | | <i>Holocalyx balansae</i> Mich. | ICN 63221 |
| | Crotalariaeae | <i>Crotalaria tweediana</i> Benth. | ICN 35349 |
| | | <i>Crotalaria hilariana</i> Benth. | ICN 116001 |
| | | <i>Crotalaria balansae</i> M. Micheli | ICN 33959 |
| | | <i>Crotalaria incana</i> L. | ICN 115963 |
| | Genisteae | <i>Lupinus guaraniticus</i> (Hassl.) C.P. Smith | ICN 138507 |
| | | <i>Lupinus linearis</i> Desr. | ICN 117049 |
| | | <i>Lupinus paranensis</i> C.P. Smith | ICN 116834 |
| | | <i>Lupinus rubriflorus</i> Planchuelo | ICN 116819 |
| | | <i>Lupinus bracteolaris</i> Desr. | ICN 93149 |
| | | <i>Lupinus multiflorus</i> Desr. | ICN 122542 |
| | | <i>Lupinus albescens</i> Hook. et Arn. | ICN 93380 |
| | | <i>Lupinus lanatus</i> Bent. | ICN 93284 |
| | | <i>Lupinus gibertianus</i> C.P. Smith | ICN 93321 |
| | | <i>Lupinus uleanus</i> C.P. Smith | ICN 117003 |
| | | <i>Lupinus magnistipulatus</i> Planchuelo & D.B. Dunn | ICN 116929 |
| | | <i>Lupinus reitzii</i> Burkart ex M. Pinheiro & Miotto | ICN 116971 |
| | Millettieae | <i>Lonchocarpus nitidus</i> (Vogel) Benth. | ICN 146911 |
| | | <i>Lonchocarpus campestris</i> Mart. ex Benth. | ICN 130941 |
| <i>Tephrosia adunca</i> Benth. | | ICN 33474 | |
| Trifolieae | <i>Trifolium polymorphum</i> Poir. | ICN 93089 | |
| | <i>Trifolium riograndense</i> Burk. | ICN 115466 | |

Tabela 5: Espécies analisadas das tribos Dalbergieae, Indigofereae e Desmodieae – Subfamília Faboideae

| SUBFAMÍLIA | TRIBO | ESPÉCIE | VOUCHER |
|---|---|---|------------|
| Faboideae | Dalbergieae | <i>Adesmia securigerifolia</i> Hert. | ICN 135776 |
| | | <i>Adesmia latifolia</i> (Spreng.) Vogel | ICN 135824 |
| | | <i>Adesmia bicolor</i> (Poir.) DC. | ICN 118187 |
| | | <i>Adesmia incana</i> Vogel var. <i>incana</i> | ICN 118066 |
| | | <i>Adesmia punctata</i> (Poir.) DC. | ICN 135777 |
| | | <i>Adesmia tristis</i> Vogel | ICN 115465 |
| | | <i>Adesmia rocinhensis</i> Burk. | ICN 146093 |
| | | <i>Adesmia psoraleoides</i> Burk. | ICN 122694 |
| | | <i>Adesmia ciliata</i> Vogel | ICN 121075 |
| | | <i>Adesmia riograndensis</i> Miotto | ICN 93516 |
| | | <i>Adesmia reitziana</i> Burk. | ICN 146069 |
| | | <i>Adesmia paranensis</i> Burk. | ICN 92974 |
| | | <i>Adesmia araujoii</i> Burk. | ICN 65565 |
| | | <i>Adesmia vallsii</i> Miotto | ICN 121069 |
| | | <i>Adesmia sulina</i> Miotto | ICN 92969 |
| | | <i>Adesmia arillata</i> Miotto | ICN 113010 |
| | | <i>Adesmia muricata</i> (Jacq.) DC. var. <i>muricata</i> | ICN 93520 |
| | | <i>Aeschynomene elegans</i> Schl. & Cham. | ICN 121085 |
| | | <i>Aeschynomene falcata</i> (Poir.) DC. var. <i>falcata</i> | ICN 122661 |
| | | <i>Stylosanthes leiocarpa</i> Vogel | ICN 40553 |
| | <i>Stylosanthes viscosa</i> Sw. | ICN 146238 | |
| | <i>Arachis burkartii</i> Handro | ICN 138060 | |
| | <i>Poiretia latifolia</i> Vogel | ICN 115468 | |
| | <i>Poiretia tetraphylla</i> (Poir.) Burk. | ICN 122665 | |
| | Indigofereae | <i>Indigofera asperifolia</i> Bong. | ICN 106275 |
| | | <i>Indigofera sabulicola</i> Benth. | ICN 116232 |
| | Desmodieae | <i>Desmodium barbatum</i> (L.) Benth. | ICN 120028 |
| | | <i>Desmodium uncinatum</i> (Jacq.) DC. | ICN 40540 |
| | | <i>Desmodium triarticulatum</i> Malme | ICN 93420 |
| | | <i>Desmodium adscendens</i> (Sw.) DC. | ICN 146450 |
| | | <i>Desmodium affine</i> Schlecht. | ICN 40098 |
| | | <i>Desmodium incanum</i> DC. | ICN 33567 |
| | | <i>Desmodium cuneatum</i> Hook. et Arn | ICN 33507 |
| <i>Desmodium polygaloides</i> Chod. et Hassl. | | ICN 49241 | |
| <i>Desmodium subsericeum</i> Malme | | ICN 40543 | |
| <i>Desmodium leiocarpum</i> (Spreng.) G. Don | | ICN 138643 | |
| <i>Desmodium pachyrhizum</i> Vogel | | ICN 40123 | |
| <i>Desmodium arechavaletae</i> Burk. | ICN 106177 | | |

Tabela 6: Espécies analisadas das tribos Phaseoleae, Sesbanieae, Loteae e Fabeae – Subfamília Faboideae

| SUBFAMÍLIA | TRIBO | ESPÉCIE | VOUCHER |
|---------------------------|------------|--|------------|
| Faboideae | Phaseoleae | <i>Calopogonium coeruleum</i> (Benth.) Sauv. | ICN 146578 |
| | | <i>Centrosema virginianum</i> (L.) Benth. | ICN 146519 |
| | | <i>Clitoria nana</i> Benth. | ICN 122511 |
| | | <i>Clitoria falcata</i> Lam. | ICN 14721 |
| | | <i>Collaea stenophylla</i> (Hook. et Arn.) Benth. | ICN 118183 |
| | | <i>Collaea speciosa</i> DC. | ICN 113370 |
| | | <i>Eriosema campestre</i> Benth. var. <i>campestre</i> | ICN 146479 |
| | | <i>Eriosema tacuarembense</i> Arech. | ICN 122176 |
| | | <i>Galactia pretiosa</i> Burk. var. <i>pretiosa</i> | ICN 121079 |
| | | <i>Galactia marginalis</i> Benth. | ICN 112979 |
| | | <i>Galactia gracillima</i> Benth. | ICN 33528 |
| | | <i>Galactia neesii</i> DC. var. <i>australis</i> Malme | ICN 120540 |
| | | <i>Galactia benthamiana</i> Mich. | ICN 35523 |
| | | <i>Galactia latisiliqua</i> Desv. var. <i>latisiliqua</i> | ICN 98856 |
| | | <i>Galactia striata</i> (Jacq.) Urban var. <i>striata</i> | ICN 44322 |
| | | <i>Macroptilium erythroloma</i> (Mart. ex Benth.) Urban | ICN 93424 |
| | | <i>Macroptilium prostratum</i> (Benth.) Urban | ICN 64438 |
| | | <i>Macroptilium heterophyllum</i> (Willd.) Marechal & Baudet | ICN 33569 |
| | | <i>Rhynchosia diversifolia</i> M. Micheli var. <i>diversifolia</i> | ICN 155211 |
| | | <i>Rhynchosia edulis</i> Gris. | ICN 146573 |
| | | <i>Rhynchosia lineata</i> Benth. | ICN 118597 |
| | | <i>Rhynchosia corylifolia</i> Mart. ex Benth. | ICN 146912 |
| | | <i>Vigna luteola</i> (Jacq.) Benth. | ICN 146459 |
| | | <i>Vigna longifolia</i> (Benth.) Verdc. | ICN 122658 |
| | | <i>Vigna peduncularis</i> (H.B.K.) Fawcett & Rendle | ICN 40062 |
| | | <i>Vigna adenantha</i> (G. Meyer) Marèchal et al. | ICN 98462 |
| | | <i>Camptosema rubicundum</i> Hook. et Arn. | ICN 33779 |
| | | <i>Canavalia bonariensis</i> Lindl. | ICN 93381 |
| | Sesbanieae | <i>Sesbania punicea</i> (Cav.) Benth. | ICN 64353 |
| | Loteae | <i>Ornithopus micranthus</i> (Benth.) Arech. | ICN 30268 |
| | Fabeae | <i>Lathyrus pubescens</i> Hook. et Arn. | ICN 114304 |
| | | <i>Lathyrus subulatus</i> Lam. | ICN 114289 |
| | | <i>Lathyrus nervosus</i> Lam. | ICN 135830 |
| | | <i>Lathyrus crassipes</i> Gill. Ex Hook. et Arn. | ICN 93095 |
| | | <i>Lathyrus paranensis</i> Burk. | ICN 93291 |
| | | <i>Lathyrus nitens</i> Vogel | ICN 114296 |
| | | <i>Lathyrus linearifolius</i> Vogel | ICN 43123 |
| | | <i>Lathyrus hasslerianus</i> Burk. | ICN 114292 |
| | | <i>Lathyrus paraguariensis</i> Hassl, | ICN 110898 |
| | | <i>Lathyrus hookeri</i> G. Don | ICN 14732 |
| | | <i>Lathyrus macrostachys</i> Vogel | ICN 35488 |
| | | <i>Vicia linearifolia</i> Hook. et Arn. | ICN 122132 |
| <i>Vicia nana</i> Vogel | | ICN 93076 | |
| <i>Vicia graminea</i> Sm. | | ICN 146081 | |

Tabela 7: Espécies analisadas das tribos Cercideae, Detarieae, Cassieae e Caesalpinieae – Subfamília Caesalpinioideae

| SUBFAMÍLIA | TRIBO | ESPÉCIE | VOUCHER | |
|------------------|-----------|--|---|------------|
| Caesalpinioideae | Cercideae | <i>Bauhinia forficata</i> Link. subsp. <i>forficata</i> | ICN 142901 | |
| | | <i>Bauhinia forficata</i> Link. subsp. <i>pruinosa</i> | ICN 121490 | |
| | | <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbr. | ICN 117416 | |
| | Detarieae | <i>Copaifera trapezifolia</i> Hayne | ICN 142290 | |
| | Cassieae | <i>Apuleia leiocarpa</i> (Vogel) Macbr. | ICN 142777 | |
| | | <i>Cassia leptophylla</i> Vogel | ICN 135802 | |
| | | <i>Chamaecrista cathartica</i> (Mart.) H.S. Irwin & Barneby | ICN 125295 | |
| | | <i>Chamaecrista desvauxii</i> (Collad.) Killip. var. <i>latistipula</i> (Benth.) G.P. Lewis | ICN 122415 | |
| | | <i>Chamaecrista flexuosa</i> (L.) Greene var. <i>flexuosa</i> | ICN 123193 | |
| | | <i>Chamaecrista nictitans</i> (L.) Moench subsp. <i>patellaria</i> (Colladon) H.S. Irwin & Barneby var. <i>ramosa</i> (Vogel) H.S. Irwin & Barneby | ICN 123218 | |
| | | <i>Chamaecrista punctata</i> (Vogel) H.S. Irwin & Barneby | ICN 119528 | |
| | | <i>Chamaecrista ramosa</i> (Vogel) H.S. Irwin & Barneby var. <i>parvifoliola</i> (Irwin) Irwin & Barneby | ICN 135930 | |
| | | <i>Chamaecrista repens</i> (Vogel) Irwin & Barneby | ICN 118073 | |
| | | <i>Chamaecrista rotundifolia</i> (Persoon) Greene var. <i>rotundifolia</i> | ICN 123320 | |
| | | <i>Chamaecrista vestita</i> (Vogel) H.S. Irwin & Barneby | ICN 129024 | |
| | | <i>Senna alata</i> (L.) Roxb. | ICN 121678 | |
| | | <i>Senna angulata</i> (Vogel) H.S. Irwin & Barneby var. <i>miscadena</i> (Vogel) H.S. Irwin & Barneby | ICN 122411 | |
| | | <i>Senna araucarietorum</i> H.S. Irwin & Barneby | ICN 122421 | |
| | | <i>Senna cernua</i> (Balbis) H.S. Irwin & Barneby | ICN 122452 | |
| | | <i>Senna corymbosa</i> (Lam.) H.S. Irwin & Barneby | ICN 124673 | |
| | | <i>Senna hilariana</i> (Benth.) H.S. Irwin & Barneby | ICN 124638 | |
| | | <i>Senna hirsuta</i> (L.) H.S. Irwin & Barneby var. <i>streptocarpa</i> H.S. Irwin & Barneby | ICN 122374 | |
| | | <i>Senna multijuga</i> (Rich.) H.S. Irwin & Barneby var. <i>peregrinatrix</i> H.S. Irwin & Barneby | ICN 121629 | |
| | | <i>Senna neglecta</i> (Vogel) H.S. Irwin & Barneby | ICN 124577 | |
| | | <i>Senna oblongifolia</i> (Vogel) H.S. Irwin & Barneby | ICN 124616 | |
| | | <i>Senna obtusifolia</i> (L.) H.S. Irwin & Barneby | ICN 124619 | |
| | | <i>Senna occidentalis</i> (L.) Link | ICN 124632 | |
| | | <i>Senna pendula</i> (Humb. & Bonpl. ex Will.) H.S. Irwin & Barneby | ICN 125266 | |
| | | <i>Senna pilifera</i> (Vogel) H.S. Irwin & Barneby | ICN 125234 | |
| | | <i>Senna rugosa</i> (G. Don) H.S. Irwin & Barneby | ICN 122394 | |
| | | <i>Senna septemtrionalis</i> (Viviane) Irwin & Barneby | ICN 123516 | |
| | | <i>Senna silvestris</i> (Vell.) H.S. Irwin & Barneby var. <i>silvestris</i> | ICN 122303 | |
| | | <i>Senna splendida</i> (Vogel) H.S. Irwin & Barneby | ICN 125240 | |
| | | <i>Senna tropica</i> (Vell.) H.S. Irwin & Barneby | ICN 123548 | |
| | | Caesalpinieae | <i>Caesalpinia echinata</i> Lam. | ICN 122364 |
| | | | <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart. ex Tul. | ICN 122334 |
| | | | <i>Caesalpinia pluviosa</i> DC. | ICN 121615 |

Tabela 8: Espécies analisadas das tribos Acacieae, Ingeae e Mimoseae – Subfamília Mimosoideae

| SUBFAMÍLIA | TRIBO | ESPÉCIE | VOUCHER |
|-------------|----------|--|------------|
| Mimosoideae | Acacieae | <i>Acacia bonariensis</i> Gill. ex Hook. et Arn. | ICN 106279 |
| | | <i>Acacia caven</i> (Mol.) Mol. | ICN 98465 |
| | | <i>Acacia ibirocayensis</i> Marchiori | ICN 90348 |
| | | <i>Acacia recurva</i> Benth. | ICN 63308 |
| | | <i>Acacia velutina</i> DC. | ICN 27618 |
| | Ingeae | <i>Calliandra brevipes</i> Benth. | ICN 53959 |
| | | <i>Calliandra foliolosa</i> Benth. | ICN 83715 |
| | | <i>Calliandra tweediei</i> Benth. | ICN 123366 |
| | Mimoseae | <i>Desmanthus virgatus</i> (L.) Willd. | ICN 34091 |
| | | <i>Desmanthus tathyensis</i> F.S. Hoehne | ICN120045 |
| | | <i>Desmanthus depressus</i> Humb. & Bonpl. ex Willd. | ICN 51769 |

II.2.2 Métodos

II.2.2.1 Preparação dos Extratos

As partes aéreas de cada espécie foram secas em estufa por 1 hora a 100°C e desintegradas. Posteriormente, foram submetidas à extração com etanol 40% na proporção de 1:20 (planta:solvente), em maceração à temperatura ambiente por um período de cinco dias. Após este período, o material foi filtrado e os extratos hidroalcoólicos resultantes foram filtrados em membrana de 0,45 µm para posterior análise cromatográfica.

II.2.2.2 Análise Cromatográfica

Foram realizadas análises qualitativas para verificar a presença das isoflavonas genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A nos extratos das espécies de leguminosas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com acoplamento a detector ultravioleta (UV).

A análise cromatográfica baseou-se no método descrito por RAMOS e colaboradores (2008), sendo as principais alterações a preparação da amostra e o sistema de eluição. Os parâmetros utilizados na análise cromatográfica estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros para análise cromatográfica de espécies de leguminosas

| Características | Descrição |
|-------------------------------------|--|
| Cromatógrafo | Cromatógrafo Waters Alliance 2695 |
| Detector | UV Photodiodo Array (PDA) Waters 996 |
| Coluna | Phenomenex C18 ¹ Fusion-RP 80A |
| Pré-coluna | Lichrospher Merck ² |
| Sistema de eluição | Gradiente |
| Fase móvel | A: Acetonitrila:Água:Ácido Trifluoroacético (20:80:0,01; v/v/v) B: Acetonitrila:Ácido Trifluoroacético (100:0,1; v/v) |
| Fluxo | 0,7 ml/mim |
| Volume de injeção | 10,0 µl |
| Comprimento de onda do cromatograma | 260nm |

¹ Dimensões da coluna / Tamanho de partícula: 4,6 X 150mm / 4µm

² Dimensões da pré-coluna / Preenchimento: 10X4mm / 37 - 55µm

O gradiente linear utilizado para a análise encontra-se descrito na Tabela 10.

Tabela 10: Sistema gradiente utilizado para a análise por CLAE de espécies de leguminosas

| Tempo (min) | Fase A (%) | Fase B (%) |
|--------------------|-------------------|-------------------|
| 0,00 | 75 | 25 |
| 10,0 | 50 | 50 |
| 11,0 | 50 | 50 |
| 12,0 | 0 | 100 |
| 13,0 | 50 | 50 |
| 20,0 | 75 | 25 |

Para confirmar a presença de cada isoflavona, foram comparados os tempos de retenção dos cromatogramas e os espectros no UV das amostras com as substâncias de referência genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A, analisadas sob as mesmas condições.

II.2.2.3 Tratamento dos Dados

Para verificar a correlação dos dados químicos observados neste trabalho com a taxonomia atual da família Leguminosae, os dados foram tratados para análise, que é realizada com o auxílio de um programa computacional.

Estes dados foram analisados baseados na presença ou ausência de cada isoflavona em todas as espécies. A presença de cada isoflavona de cada amostra foi agrupada numa matriz com x amostras de plantas (todas que apresentaram ao menos uma isoflavona), por quatro compostos (genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A), para ser tratada por métodos estatísticos de classificação e ordenação multivariada. As espécies que não apresentaram as isoflavonas investigadas no *screening* não foram incluídas na matriz.

A análise de dados foi feita com o auxílio do programa computacional “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System – NTSYS” versão 2.1 (ROHLF, 2001). O coeficiente para cálculo de similaridade utilizado para a análise das diferentes espécies foi o de Jaccard. Com os dados de similaridade, foi realizada a análise de agrupamento (módulo SAHN do NTSYS), utilizando o método da média das distâncias (UPGMA – Unweighted Poir-Group Method using Arithmetic Average), e foi realizada a construção de um dendograma.

Para a verificação da consistência dos dendogramas gerados a partir da matriz de similaridade das espécies, foi gerada uma matriz cofenética a partir do módulo COPH do programa NTSYS.

II.3 Resultados e Discussão

Muitos métodos para dosar o teor de isoflavonas em plantas, usando cromatografia líquida de alta eficiência combinada com detector espectrométrico de ultravioleta, foram reportados na literatura (WU *et al.*, 2003; VETTER, 1995; HE *et al.*, 1996; KLEJDUS *et al.*, 2001; KRENN *et al.*, 2002). Grande parte dos estudos desenvolvidos para a quantificação de isoflavonas apresentou como desvantagem a

determinação de apenas três compostos por vez, e o excesso de tempo consumido no procedimento.

O método utilizado nesta pesquisa tem como principais vantagens a facilidade e a rapidez na preparação das amostras, a capacidade de avaliar as isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A ao mesmo tempo e a rapidez da análise cromatográfica, quando comparada com outras já descritas na literatura.

A Figura 4 ilustra o cromatograma das isoflavonas de referência, mostrando seus tempos de retenção e seus espectros no ultravioleta, os quais foram utilizados em conjunto para identificação destes compostos nas espécies de leguminosas analisadas. Apesar da última determinação de isoflavonas ocorrer aos 13 minutos de análise, optou-se por uma análise cromatográfica de 20 minutos, para evitar erros de contaminação entre as análises, visto que as espécies foram analisadas em sequência.

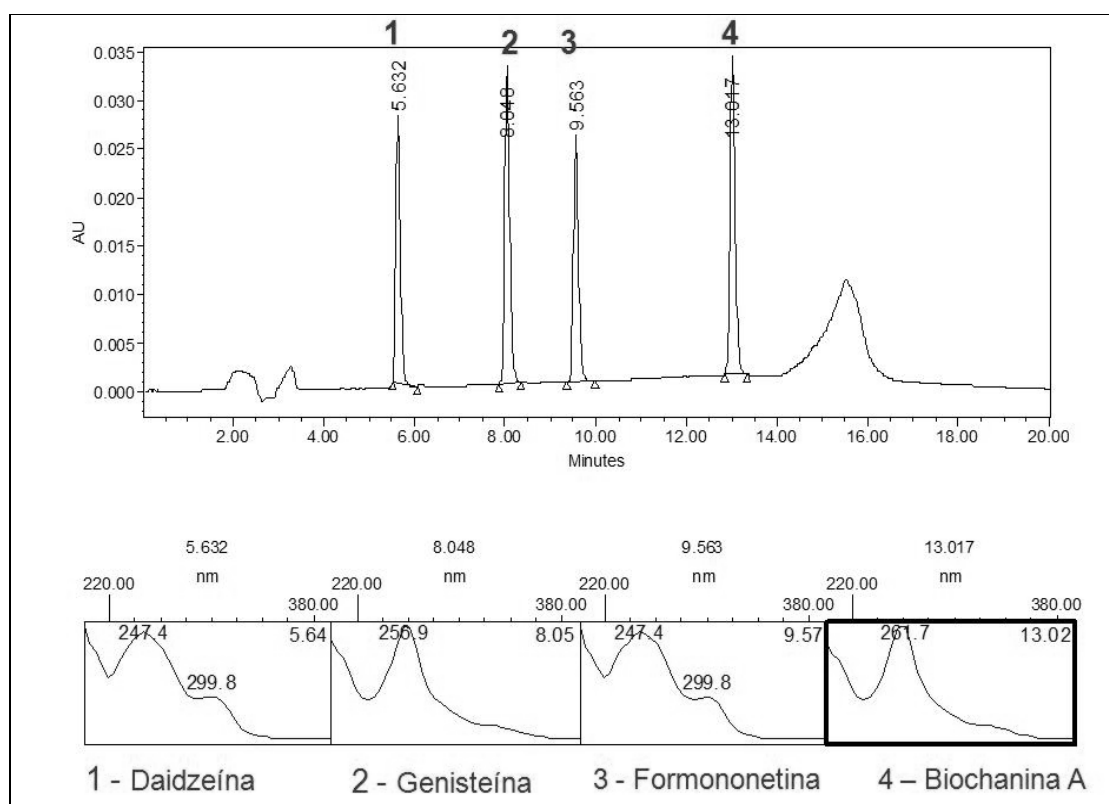


Figura 4: Cromatograma e espectros no ultravioleta das isoflavonas de referência daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A

Após análises dos perfis cromatográficos obtidos, verificou-se que 42 espécies da subfamília Faboideae, das 105 analisadas, apresentaram ao menos uma das quatro isoflavonas investigadas, ou seja, 40% das espécies desta subfamília. Já nas subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae, nenhuma das espécies analisadas apresentou qualquer uma das quatro isoflavonas.

Conforme VEITCH (2007), a ocorrência de isoflavonóides é restrita à subfamília Faboideae, sendo uma característica química notável em Leguminosas. Apenas em cinco espécies de outras subfamílias foram encontrados isoflavonóides: *Apuleia leiocarpa*, *Cassia javanica* e *Senna siamea* (subfamília Caesalpinioideae), e *Albizia procera* e *Prosopis juliflora* (subfamília Mimosoideae) (INGHAM, 1983; ILYAS *et al.*, 1994; SHAFIULLAH *et al.*, 1995).

A tribo Swartzieae compreende 17 gêneros e cerca de 260 espécies. É amplamente neotropical e distribui-se desde o México até a Argentina, Caribe, África e Madagascar. Até o momento, Swartzieae mantém sua posição basal dentro das Papilionoideae (IRELAND *apud* LEWIS *et al.*, 2005).

Das duas espécies analisadas da tribo Swartzieae nativas do sul do Brasil, *Holocalyx balansae* apresentou apenas a isoflavona biochanina A, enquanto que *Ateleia glazioviana* não apresentou nenhuma das quatro isoflavonas pesquisadas. Ao verificar dados na literatura, constatou-se que esta espécie apresenta outras isoflavonas, como, por exemplo, a glaziovianina A, isolada de suas folhas (YOKOSUKA *et al.*, 2007).

Já sobre a presença de isoflavonas na espécie *Holocalyx balansae*, não há relatos na literatura, sendo um achado importante na caracterização das espécies da tribo Swartzieae.

A atual circunscrição da tribo Crotalarieae inclui 11 gêneros e cerca de 1.200 espécies. Esta tribo apresenta uma monofilia bem suportada por evidências moleculares e por análises cladísticas de caracteres morfológicos, citológicos e químicos (VAN WYK *apud* LEWIS *et al.*, 2005). Das quatro espécies de *Crotalaria*

investigadas (tribo Crotalariaeae), apenas a espécie *Crotalaria balansae* apresentou uma das isoflavonas analisadas (genisteína). Na literatura, não foram encontrados estudos sobre a presença de isoflavonas em espécies deste gênero e tribo.

Da tribo Genisteae, foram analisadas 12 espécies, todas do gênero *Lupinus*. Destas, 11 apresentaram as isoflavonas investigadas, conforme pode ser observado na Tabela 11.

Tabela 11: Presença das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A em espécies da tribo Genisteae

| Tribo | Espécie | D | G | F | B |
|-----------|--------------------------------|---|---|---|---|
| Genisteae | <i>Lupinus guaraniticus</i> | | | | |
| | <i>Lupinus linearis</i> | | | | + |
| | <i>Lupinus paranensis</i> | | + | | + |
| | <i>Lupinus rubriflorus</i> | | | | + |
| | <i>Lupinus bracteolaris</i> | | + | | + |
| | <i>Lupinus multiflorus</i> | | | | + |
| | <i>Lupinus albescens</i> | | + | | + |
| | <i>Lupinus lanatus</i> | | + | | |
| | <i>Lupinus gibertianus</i> | | + | | + |
| | <i>Lupinus uleanus</i> | | | | + |
| | <i>Lupinus magnistipulatus</i> | | | + | |
| | <i>Lupinus reitzii</i> | | | | + |

D = Daidzeína, G= Genisteína, F = Formononetina, B = Biochanina A

+ = Presença

A espécie *Lupinus guaraniticus*, que não apresentou nenhuma das isoflavonas, tem uma característica botânica diferente das demais espécies de *Lupinus* analisadas: é unifoliolado, enquanto que as outras espécies são multifolioladas. Todas as espécies multifolioladas deste trabalho apresentaram ao menos uma das isoflavonas.

As isoflavonas encontradas nesta tribo foram exclusivamente genisteína e biochanina A. As espécies *Lupinus gibertianus*, *Lupinus albescens*, *Lupinus bracteolaris* e *Lupinus paranensis* apresentaram ambas, enquanto as outras apresentaram uma em detrimento da outra. A isoflavona biochanina A é derivada da isoflavona genisteína. Estruturalmente, apresentam o mesmo esqueleto, porém biochanina A apresenta um grupo metoxila na posição C4'.

Das espécies de *Lupinus* analisadas neste trabalho, a única que tem descrita uma isoflavona como produto de seu metabolismo secundário é a espécie *Lupinus lanatus*. A isoflavona diprenilada angustona A foi isolada do nódulo desta espécie por SOUZA FILHO (2004). Conforme TAHARA e colaboradores (1989), isoflavonas com cadeias laterais preniladas e derivados destes compostos são de ocorrência comum no gênero *Lupinus*.

As outras espécies de *Lupinus* citadas neste trabalho até então não haviam sido investigadas quanto à presença de isoflavonas, o que surpreende, dada a distribuição farta das espécies deste gênero, principalmente na região sul do Brasil.

O gênero *Lupinus* possui alcalóides quinolizidínicos como metabólitos característicos. Estes são utilizados em quimiotaxonomia e investigações evolutivas que incluem o gênero *Lupinus* (WINK *et al.*, 1995). A utilização conjunta dos dados da presença de isoflavonas e de alcalóides pode contribuir nestes estudos.

Da tribo Trifolieae, foram analisadas duas espécies nativas da região sul. *Trifolium polymorphum* apresentou as isoflavonas genisteína e formononetina, enquanto *Trifolium riograndense* apresentou as quatro isoflavonas investigadas.

As isoflavonas são muito comuns em espécies do gênero *Trifolium*, principalmente daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A (BLANCO *et al.*, 1982). Porém, até então nenhuma espécie nativa do sul do Brasil havia sido investigada quimicamente.

A espécie *Trifolium riograndense* é muito abundante nas formações campestres da região serrana do Rio Grande do Sul. Esta espécie apresentou as mesmas quatro isoflavonas que estão presentes no trevo-vermelho (*Trifolium pratense*), espécie exótica cultivada no estado, o qual possui inúmeras atividades farmacológicas atribuídas ao seu extrato.

Na Figura 5, pode ser observado o cromatograma desta espécie, mostrando os tempos de retenção e os espectros no ultravioleta de cada um dos compostos de interesse retidos.

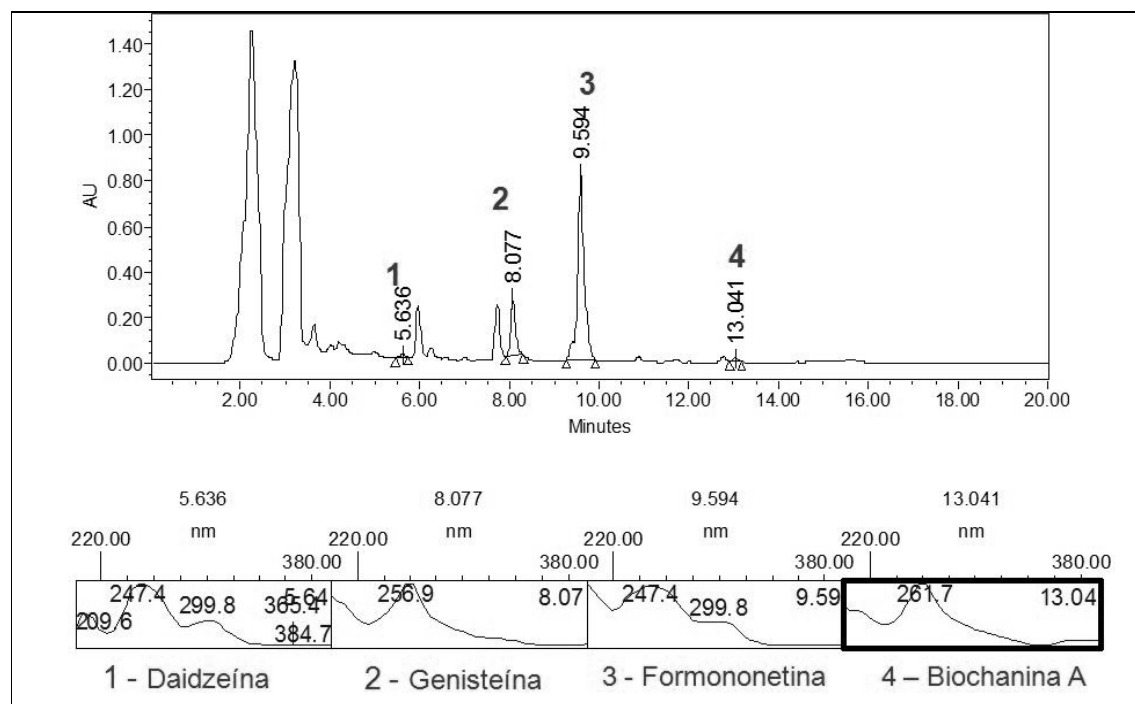


Figura 5: Cromatograma e espectros no ultravioleta das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A encontradas na espécie *Trifolium riograndense*

Estudos de quantificação destas isoflavonas em diferentes órgãos vegetais de *Trifolium riograndense* e estudos de atividade antiinflamatória do seu extrato poderão ser apreciados nos capítulos III e IV deste trabalho.

Na tribo Dalbergieae, 16 espécies das 24 analisadas apresentaram ao menos uma das isoflavonas investigadas (Tabela 12), o que corresponde à porcentagem expressiva de 66,67%. Surpreendentemente, até então, nenhuma das espécies desta tribo havia sido investigada quanto à presença destes compostos, sendo este resultado de muita importância no incentivo a estudos futuros.

Tabela 12: Presença das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A em espécies da tribo Dalbergieae

| Tribo | Espécie | D | G | F | B |
|------------------------------|--------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Dalbergieae | <i>Adesmia securigerifolia</i> | | | + | + |
| | <i>Adesmia latifolia</i> | | + | + | + |
| | <i>Adesmia. bicolor</i> | | + | + | |
| | <i>Adesmia incana</i> | | | | |
| | <i>Adesmia punctata</i> | | | + | + |
| | <i>Adesmia tristis</i> | | | + | + |
| | <i>Adesmia rocinhensis</i> | | + | | |
| | <i>Adesmia psoraleoides</i> | | | | |
| | <i>Adesmia ciliata</i> | + | | + | + |
| | <i>Adesmia riograndensis</i> | + | + | + | |
| | <i>Adesmia reitziana</i> | | | | |
| | <i>Adesmia paranensis</i> | | | + | |
| | <i>Adesmia araujoii</i> | | | + | |
| | <i>Adesmia vallsii</i> | | | | |
| | <i>Adesmia sulina</i> | | | + | |
| | <i>Adesmia arillata</i> | | | + | |
| | <i>Adesmia muricata</i> | | | + | |
| | <i>Aeschynomene elegans</i> | | | | |
| | <i>Aeschynomene falcata</i> | | | | |
| | <i>Stylosanthes leiocarpa</i> | | | | |
| <i>Stylosanthes. viscosa</i> | | + | | + | |
| <i>Arachis burkartii</i> | | | | | |
| <i>Poiretia latifolia</i> | | | + | | |
| <i>Poiretia tetraphyla</i> | | | + | + | |

D = Daidzeína, G= Genisteína, F = Formononetina, B = Biochanina A

+ = Presença

Das espécies da tribo Desmodieae analisadas neste trabalho, apenas *Desmodium barbatum* e *Desmodium adscendens* apresentaram isoflavonas (genisteína em ambas), conforme mostra a Tabela 14.

Tabela 13: Presença das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A em espécies da tribo Desmodieae

| Tribo | Espécie | D | G | F | B |
|--------------|---------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Desmodieae | <i>Desmodium barbatum</i> | | + | | |
| | <i>Desmodium uncinatum</i> | | | | |
| | <i>Desmodium triarticulatum</i> | | | | |
| | <i>Desmodium adscendens</i> | | + | | |
| | <i>Desmodium affine</i> | | | | |
| | <i>Desmodium incanum</i> | | | | |
| | <i>Desmodium cuneatum</i> | | | | |
| | <i>Desmodium polygaloides</i> | | | | |
| | <i>Desmodium subsericeum</i> | | | | |
| | <i>Desmodium leiocarpum</i> | | | | |
| | <i>Desmodium pachyrhizum</i> | | | | |
| | <i>Desmodium arechavaletae</i> | | | | |

D = Daidzeína, G= Genisteína, F = Formononetina, B = Biochanina A

+ = Presença

Isoflavonas já foram relatadas em espécies de *Desmodium* (SU *et al.*, 1993). Das espécies nativas analisadas neste trabalho, a espécie *Desmodium uncinatum* já teve relatada a presença de isoflavonóides, um pterocarpano e duas isoflavanonas (GUCHU *et al.*, 2007). Nenhum relato sobre a presença de isoflavonas nas outras espécies foi encontrado descrito na literatura científica.

Atualmente, a tribo Phaseoleae conta com 89 gêneros e cerca de 1.580 espécies. Foram analisadas 28 espécies nativas do sul do Brasil. Observou-se uma baixa incidência das isoflavonas nessas espécies. Conforme apresentado na Tabela 14, as isoflavonas estão presentes em apenas cinco espécies, o que equivale a 17,86%.

Tabela 14: Presença das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A em espécies da tribo Phaseoleae

| Tribo | Espécie | D | G | F | B |
|--------------|-----------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Phaseoleae | <i>Calopogonium coeruleum</i> | | | | |
| | <i>Centrosema virginianum</i> | | | + | + |
| | <i>Clitoria nana</i> | | | | |
| | <i>Clitoria falcata</i> | | | | |
| | <i>Collaea stenophylla</i> | | | | |
| | <i>Collaea speciosa</i> | | | | |
| | <i>Eriosema campestre</i> | | | | |
| | <i>Eriosema tacuarembense</i> | | | | |
| | <i>Galactia pretiosa</i> | | | | |
| | <i>Galactia marginalis</i> | | | | |
| | <i>Galactia gracillima</i> | | | | |
| | <i>Galactia neesii</i> | | | | |
| | <i>Galactia benthamiana</i> | | | | |
| | <i>Galactia latisiliqua</i> | | | | |
| | <i>Galactia striata</i> | | | | |
| | <i>Macroptilium erythroloma</i> | | | | |
| | <i>Macroptilium prostratum</i> | | | | |
| | <i>Macroptilium heterophyllum</i> | | | | |
| | <i>Rhynchosia diversifolia</i> | | | | |
| | <i>Rhynchosia edulis</i> | | | | |
| | <i>Rhynchosia lineata</i> | | | | + |
| | <i>Rhynchosia corylifolia</i> | | | | |
| | <i>Vigna luteola</i> | | | | |
| | <i>Vigna longifolia</i> | | | + | |
| | <i>Vigna peduncularis</i> | | | | |
| | <i>Vigna adenantha</i> | | | + | |
| | <i>Camptosema rubicundum</i> | | | | + |
| | <i>Canavalia bonariensis</i> | | | | |

D = Daidzeína, G= Genisteína, F = Formononetina, B = Biochanina A

+ = Presença

Dentre as espécies que apresentaram isoflavonas, a espécie *Centrosema virginianum* ainda não tinha sido estudada quimicamente. Porém, outra espécie deste gênero, *Centrosema pubescens*, já foi estudada e teve isoflavonóides isolados (TOSTES *et al.*, 1997; TOSTES *et al.*, 1999). Das quatro espécies do gênero *Rhynchosia* investigadas, apenas *Rhynchosia lineata* apresentou uma das isoflavonas. Até então, só há relatos na literatura de isoflavonas na espécie *Rhynchosia volubilis* (KANG *et al.*, 2001).

As duas espécies de *Vigna* que apresentaram a isoflavona genisteína nunca haviam sido analisadas quimicamente. Porém, isoflavonas já foram descritas nas folhas das espécies *Vigna aconitifolia*, *Vigna radiata*, *Vigna unguiculata*, *Vigna umbellata* e nas sementes das espécies *Vigna angularis*, *Vigna unguiculata* e *Vigna radiata* (KAUFMAN *et al.*, 1997). A espécie *Camptosema rubicundum*, que apresentou a isoflavona formononetina, é a primeira espécie deste gênero a ser avaliada quanto à presença de isoflavonas, não havendo nenhum relato na literatura.

Da tribo Sesbanieae, só foi analisada uma espécie nativa da região sul brasileira: *Sesbania punicea*. Esta espécie apresentou as isoflavonas genisteína e biochanina A. Conforme a literatura disponível, nenhum estudo sobre a presença de isoflavonóides fora realizado com esta espécie. Outras duas espécies deste gênero, *Sesbania sesban* e *Sesbania grandiflora* apresentaram isoflavonas. A primeira apresentou pratenseína em seu caule, e a segunda apresentou tectorigenina em suas raízes (VEITCH, 2007).

A tribo Loteae teve uma espécie nativa analisada no presente trabalho, *Ornithopus micranthus*, que apresentou as isoflavonas formononetina e biochanina A. Não se sabe sobre a ocorrência de isoflavonas em espécies deste gênero, dado que, até então, elas não foram estudadas sob este ponto de vista.

Por fim, a tribo Fabeae apresentou as isoflavonas em duas de suas espécies. As espécies *Lathyrus nitens* e *Lathyrus hasslerianus* apresentaram a isoflavona formononetina. Não há na literatura estudos com estas duas espécies. Além do

gênero *Lathyrus*, o outro gênero analisado da tribo Fabeae foi o gênero *Vicia*. Apesar das espécies de *Vicia* nativas do sul do Brasil analisadas não apresentarem nenhuma das quatro isoflavonas investigadas, foram encontrados na literatura estudos com a espécie *Vicia faba*, que apresenta níveis elevados de daidzeína e genisteína (KAUFMAN *et al.*, 1997).

As únicas tribos da subfamília Faboideae que não apresentaram as isoflavonas em suas espécies nativas analisadas foram Indigofereae e Millettieae. Apesar disto, foram encontrados relatos de isoflavonas em outras espécies destas tribos, como, por exemplo, a espécie *Indigofera linnaei* (PRASAD & CHAKRADHAR, 2004) da tribo Indigofereae, e as espécies *Lonchocarpus subglaucescens* (MAGALHÃES *et al.*, 1996), *Lonchocarpus nicou* (KAOUADJI *et al.*, 1986), *Tephrosia maxima* (MURTHY & RAO, 1985), *Tephrosia viridiflora* (GOMEZ *et al.*, 1985) e *Tephrosia purpurea* (CHANG *et al.*, 1997), da tribo Millettieae.

As isoflavonas são muito consumidas como suplementos alimentares nos Estados Unidos e na Europa para mulheres que sofrem com os sintomas da menopausa. Com isso, há um aumento na demanda por novos suplementos e fontes de isoflavonas alternativas além da soja. O fato de 42 espécies nativas do sul do Brasil analisadas neste trabalho apresentarem estas isoflavonas é muito importante na busca por novas fontes de isoflavonas.

No entanto, a existência de isoflavonas em espécies de leguminosas tem implicações na nutrição do gado e de outros animais de campo, visto que as espécies da subfamília Faboideae são muito utilizadas como forrageiras. Os principais efeitos destes compostos, quando consumidos em alta quantidade, dizem respeito à área reprodutiva, como esterilidade temporária ou permanente, abortos, mortalidade neonatal e prolapsos uterinos (MULLER *apud* VETTER, 1995).

Sabe-se que as isoflavonas em geral são fortes marcadores quimiosistemáticos da família Leguminosae. Por isso, a identificação de isoflavonas em espécies desta família de ocorrência na região sul do Brasil é de muita importância no contexto taxonômico destes vegetais.

Em vista disso, realizou-se uma análise de agrupamento, para verificar se a circunscrição taxonômica dos grupos baseadas nas presenças de cada isoflavona coincide com aquela definida por caracteres morfológicos. A análise de correspondência (agrupamento, “cluster”), é um método de estatística multivariada. Este método pode ser utilizado no sentido de interpretar combinações de componentes químicos subjacentes à estrutura quimiotaxonômica.

O dendograma de classificação das 42 amostras de Leguminosas está apresentado na figura 6.

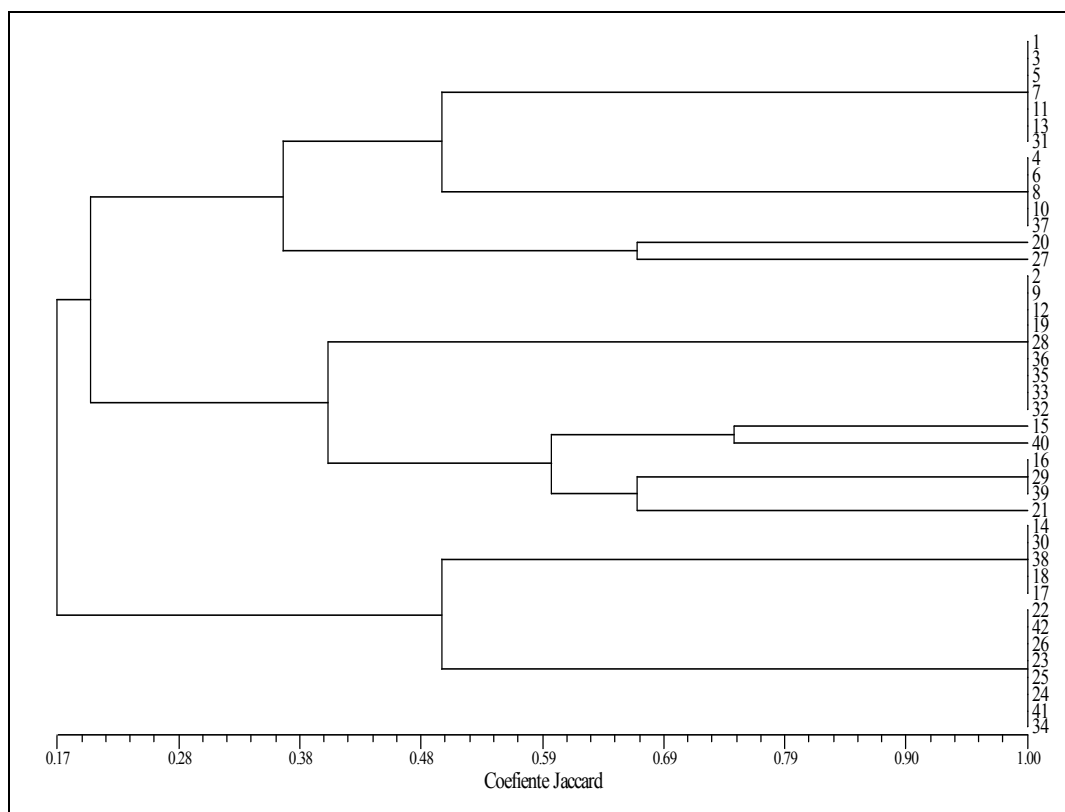


Figura 6: Dendograma das 42 amostras de Leguminosas que apresentaram as isoflavonas

LEGENDA: 1 – Espécie da Tribo Swartzieae (*Holocalyx balansae*); 2 – Espécie da Tribo Crotalariaeae (*Crotalaria balansae*); 3 a 13 – Espécies da Tribo Genisteae (3 – *Lupinus lineares*, 4 – *Lupinus paranensis*, 5 – *Lupinus rubriflorus*, 6 – *Lupinus bracteolaris*, 7 – *Lupinus multiflorus*, 8 – *Lupinus albescens*, 9 – *Lupinus lanatus*, 10 – *Lupinus gibertianus*, 11 – *Lupinus uleanus*, 12 – *Lupinus magnistipulatus*, 13 – *Lupinus reitzii*); 14 a 29 – Espécies da Tribo Dalbergieae (14 – *Adesmia securigerifolia*, 15 – *Adesmia latifolia*, 16 – *Adesmia bicolor*, 17 – *Adesmia punctata*, 18 – *Adesmia tristis*, 19 – *Adesmia rocinhensis*, 20 – *Adesmia ciliata*, 21 – *Adesmia riograndensis*, 22 – *Adesmia paranensis*, 23 – *Adesmia araujoi*, 24 – *Adesmia sulina*, 25 – *Adesmia arillata*, 26 – *Adesmia muricata*, 27 – *Stylosanthes viscosa*, 28 – *Poiretia latifolia*, 29 – *Poiretia tetraphylla*); 30 a 34 – Espécies da Tribo Phaseoleae (30 – *Centrosema virginianum*, 31 – *Rynchosia lineata*, 32 – *Vigna longifolia*, 33 – *Vigna adenantha*, 34 – *Camptosema rubicundum*); 35 a 36 – Espécies da Tribo Desmodieae (35 – *Desmodium barbatum*, 36 – *Desmodium adscendens*); 37 – Espécie da Tribo Sesbanieae (*Sesbania puniceae*); 38 – Espécie da Tribo Loteae (*Ornithopus micranthus*); 39 a 40 – Espécies da Tribo Trifolieae (39 – *Trifolium polymorphum*, 40 – *Trifolium riograndense*); 41 a 42 – Espécies da Tribo Fabeae (41 – *Lathyrus nitens*, 42 – *Lathyrus hasslerianus*).

Não houve correspondência entre a presença das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A e a classificação taxonômica já existente. Há a necessidade de avaliar a presença de mais tipos de isoflavonas, inclusive quantitativamente, para verificar se a circunscrição das espécies em cada tribo confere com a distribuição taxonômica existente. Além disso, foi feita uma análise apenas com dados obtidos a partir de 42 espécies que apresentaram isoflavonas neste trabalho, sendo uma parcela muito pequena de táxons desta família.

**CAPÍTULO III – DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ISOFLAVONAS EM
*TRIFOLIUM RIOGRANDENSE***

III.1 Gênero *Trifolium*

III.1.1 Aspectos Morfológicos e de Cultivo

O gênero *Trifolium*, pertencente à família Leguminosae, subfamília Faboideae, compreende cerca de 250 espécies, sendo um dos mais importantes gêneros dessa família. O nome do gênero faz referências às distintas folhas, usualmente compostas por três folíolos. Todas as espécies são ervas perenes ou anuais e raramente têm altura superior a 50 cm. São conhecidas popularmente como trevos.

Ocorre em quase toda a zona temperada e subtropical do mundo, em uma grande variedade de habitats, incluindo prados e campinas, florestas abertas, semi-desertos, montanhas e picos alpinos. Uma característica comum desses diversos habitats é a alta radiação solar, visto que poucas espécies de trevo toleram sombra (ZOHARY & HELLER, 1984).

Algumas espécies deste gênero ocorrem naturalmente em pastagens, outras são cultivadas. Atualmente, espécies de *Trifolium* têm sido cultivadas extensivamente como plantas forrageiras. Dentre as espécies de *Trifolium*, 25 são importantes para este fim, das quais três apresentam posição de destaque: *Trifolium repens* (trevo-branco), *Trifolium pratense* (trevo-vermelho) e *Trifolium subterraneum* (trevo-subterrâneo) (ZOHARY & HELLER, 1984).

Há muitas razões para o cultivo dessas espécies como forrageiras: crescem livremente, constituem-se em boa pastagem nos prados, podem ser usados para produção de forragem verde ou seca, apresentam ótimos teores de fósforo, cálcio e proteína bruta e apresentam alta digestibilidade (KAPPEL, 1967).

Os trevos apresentam excelente adaptação aos diversos tipos de solo (ácidos, arenosos ou neutros) e de clima. Além disso, melhoram o solo devido à habilidade em fixar nitrogênio atmosférico através da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* (ZOHARY & HELLER, 1984), atividade importante em plantas da família Leguminosae (ZUANAZZI *et al.*, 1998). As espécies de *Trifolium*, além de

constituintes das pastagens naturais, podem ser cultivadas em associação com gramíneas (EVANS, 1976).

Na América do Sul, há apenas 13 espécies nativas, que ocorrem no Peru, Bolívia, Chile, Uruguai, Argentina e sul do Brasil. No Rio Grande do Sul, existem três espécies de *Trifolium* nativas: *Trifolium riograndense*, *Trifolium polymorphum* e *Trifolium argentinense*, que pertencem à seção *Lotoidea*.

III.1.2 Fitoquímica

Quanto ao padrão químico, as espécies do gênero *Trifolium* se caracterizam pela presença de flavonóides, entre os quais se destacam as isoflavonas, além de apresentarem também saponinas, terpenos e taninos.

III.1.2.1 Flavonóides

Os primeiros estudos com a espécie *Trifolium pratense*, realizados na década de 50, resultaram no isolamento de biochanina A (POPE *et al.*, 1953). Em 1965, SCHULTZ mostrou a presença de biochanina A e formononetina no trevo-vermelho na forma glicosídica. Além destes compostos, a espécie *Trifolium pratense* apresenta em sua constituição mais de 30 flavonóides, como genistina, isoquercitrina, ononina, daidzeína e sissotrina (HE *et al.*, 1996), além de diversos malonatos, como genistina 6''-O-malonato, formononetina 7-O- β -D-glicosídeo 6''-O-malonato, biochanina A 7-O- β -D-glicosídeo 6''-O-malonato e 3-metilquercetina 7-O- β -D-glicosídeo 6''-O-malonato, por exemplo (LIN *et al.*, 2000).

Já a espécie *Trifolium repens*, de nome popular trevo-branco, teve identificados os flavonóides quercetina, acacetina, ramnetina, além de flavonas, como a 4',5,6,7,8-pentahidróxi-3-metoxiflavona; a 3,7-diidróxi-4'-metoxiflavona e a 5,6,7,8-tetrahidróxi-4'-metoxiflavona (PONCE *et al.*, 2004). Também já foi relatada a presença de miricetina e canferol nesta espécie (PRATI *et al.*, 2007).

A quercetina está presente em 49 espécies de *Trifolium* analisadas

Em um estudo de OLESZEK & STOCHMAL (2002), 57 espécies de *Trifolium* foram avaliadas quanto à presença de flavonóides. Destas, 54 apresentaram flavonóides, sendo que algumas espécies apresentaram uma concentração de quercetina em torno de 3,00 mg/g (material seco). As maiores concentrações de quercetina foram encontradas nas seguintes espécies: *Trifolium desvauxii* (2,53 mg/g), *Trifolium michelianum* ssp. *balansae* (2,80 mg/g), *Trifolium xerocephalum* (2,71 mg/g), *Trifolium pallidum* (3,07 mg/g) e *Trifolium phleoides* (3,17 mg/g).

A espécie *Trifolium alexandrinum* apresentou os flavonóides taxifolina e luteolina (PRATI *et al.*, 2007), além da quercetina (OLESZEK & STOCHMAL, 2002).

III.1.2.2 Saponinas e Triterpenos

Em 2002, OLESZEK & STOCHMAL estudaram a presença de saponinas em 57 espécies de *Trifolium*, sendo que todas as analisadas apresentaram como constituinte a sojasaponina I. O composto 22-O-diglicosídeo de sojasaponina I também foi encontrado nessas espécies. É sugerido que os glicosídeos de sojasapogenol sejam reconhecidos como marcadores quimiotaxonômicos para a família Leguminosae.

A partir de *Trifolium repens*, foram isoladas, além das sojasaponinas, cinco saponinas triterpênicas, denominadas cloversaponinas (SAKAMOTO *et al.*, 1992). Da espécie *Trifolium alexandrinum* foram isolados sete triterpenos glicosídicos do tipo oleaneno (MOHAMED *et al.*, 1995).

III.1.2.3 Terpenos voláteis

Foram obtidos óleos voláteis de *Trifolium glanduliferum*, *Trifolium strictum* e *Trifolium subterraneum*, sendo que compostos como β -ionona e 2,6-dimetilocta-5,7-dien-3-ol estiveram presentes nas três espécies analisadas, além de outros compostos voláteis, como alcoóis e aldeídos (WANG *et al.*, 1999).

Também foi possível identificar diversos compostos voláteis presentes em *Trifolium pratense*. Dentre os terpenos, os compostos sesquiterpênicos β -

cariofileno, α -humuleno e β -farneseno e o monoterpene β -ionona foram os constituintes mais representativos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

III.1.2.4 Taninos

FAY & DALE (1993) pesquisaram a presença de taninos condensados em 59 espécies de *Trifolium*, sendo que as espécies *Trifolium arvense*, *Trifolium aureum*, *Trifolium badium*, *Trifolium campestre*, *Trifolium dubium*, *Trifolium micranthum*, *Trifolium patens* e *Trifolium spadiceum* apresentaram taninos na sua composição química.

III.1.3 Farmacologia

Na medicina popular, o trevo-vermelho (*Trifolium pratense*) é empregado como depurador do sangue, expectorante e sedativo (BOOTH & PIERSEN, 2005). Esta é a principal espécie do gênero submetida a estudos biológicos, sendo que a maioria deles está relacionada a problemas decorrentes da menopausa. Os efeitos dos extratos de trevo-vermelho na menopausa, saúde do osso, cognição, sistema cardiovascular e saúde da mama são relatados em diversos trabalhos.

BECK e colaboradores (2005) compararam a atividade hormonal de extratos de plantas padronizados usados em grande escala para Terapia de Reposição Hormonal (TRH). Foram utilizados extratos de trevo-vermelho, grão de soja (*Glycine max*) e cimicifuga (*Cimicifuga racemosa*). Testados *in vitro*, todos os extratos derivados de trevo-vermelho e de soja demonstraram clara atividade estrogênica, afinidade pelo receptor de progesterona (RP) e também para o receptor androgênico (RA), enquanto que os receptores derivados de cimicifuga não demonstraram estas propriedades.

Outro estudo demonstrou que um suplemento alimentar composto de isoflavonas derivadas do trevo-vermelho é uma alternativa efetiva para aliviar os sintomas vasomotores em mulheres pós-menopausa, reduzindo a frequência média diária e a severidade dos fogachos (JERI, 2002).

ATKINSON e colaboradores (2004) realizaram um estudo para determinar os efeitos do consumo de um suplemento alimentar com isoflavonas derivadas do trevo-vermelho por 1 ano para avaliar a Densidade Mineral dos Ossos (DMO) e o Conteúdo Mineral dos Ossos (CMO) da espinha lombar e do quadril, e também avaliar os marcadores de formação de ossos. Neste trabalho, a perda do CMO da espinha lombar e da DMO foram significativamente menores nas mulheres que tomaram o suplemento de isoflavonas comparado com as que tomaram placebo. Não houve efeitos significantes com o tratamento no CMO e na DMO do quadril. Os marcadores de formação dos ossos foram significativamente aumentados no grupo tratado.

KROYER (2004) demonstrou que extrato de folhas de trevo-vermelho possui efetiva atividade antioxidante e capacidade de seqüestrar radicais livres.

Em relação a outras espécies estudadas farmacologicamente, um estudo com o extrato alcoólico de *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum* revelou atividades antiinflamatórias e antioxidantes em ratos artríticos. O extrato reduziu significativamente o edema de pata induzido e inibiu a peroxidação lipídica (SABUDAK *et al.*, 2008). Em outro estudo, foi investigado o potencial antioxidante de extratos hexânicos de cinco espécies de *Trifolium*: *Trifolium balansae*, *Trifolium stellatum*, *Trifolium nigrescens* subsp. *petrisavii*, *Trifolium constantinopolitanum* e *Trifolium resupinatum* var. *resupinatum*. As cinco espécies apresentaram potencial antioxidante (SABUDAK *et al.*, 2009).

III.2 *Trifolium riograndense* Burkart

Trifolium riograndense é uma espécie endêmica do sul do Brasil, ocorrendo freqüentemente na metade norte do Rio Grande do Sul, nos Campos de Cima da Serra, Planalto Médio, Encostas Superior e Inferior do Nordeste do estado. Em vista disso, é conhecida popularmente como trevo-serrano (BURKART, 1987). É uma planta perene, rasteira, de até 50 cm de comprimento e 0,15 cm de diâmetro, com talos estoloníferos longos e radicantes (KAPPEL, 1967).

As folhas jovens são densamente pubescentes, as adultas só na face abaxial, estando inseridas nos nós, que podem ser densamente pilosos. Os folíolos não têm manchas, são obcordados com base cuneada, denteados nas porções laterais e lisos no ápice emarginado. As estípulas são membranosas, lanceoladas, agudas, com tricomas longos e ralos, soldadas aos pecíolos que têm até 12 cm de comprimento (IZAGUIRRE, 1995). Os pedúnculos florais são axilares, mais longos que os pecíolos. As inflorescências são solitárias e densas (20 – 50 flores) do tipo corimbo, ovóides a esféricas (semiglobosas e globosas) com 1 – 1,5 cm de diâmetro.

As flores são curto-pediceladas e tem brácteas menores nas flores superiores do que nas inferiores. A corola é persistente, com coloração vermelha e rosada a lilás. A espécie pode ser autogâmica ou com fecundação cruzada, necessitando de estímulo mecânico para a produção de sementes. O fruto é um legume elíptico, deiscente com uma a duas sementes cordiformes, amarelo-claras a esverdeadas (ZOHARY & HELLER, 1984).

Trifolium riograndense (Figura 7) floresce de agosto a novembro, viceja bem no inverno, suporta satisfatoriamente o pastoreio, é resistente ao frio e apresenta boa produção de matéria verde (BARRETO & KAPPEL, 1964).



Figura 7 – Partes aéreas de *Trifolium riograndense*

Em virtude do bom potencial forrageiro apresentado pela espécie, a mesma tem sido foco de inúmeros trabalhos de avaliação agrônômica, aspectos reprodutivos, citogenética, entre outros (MORAES *et al.*, 1989). No entanto, até o presente momento, não há na literatura científica nenhum estudo químico e de atividades biológicas para esta espécie.

III.3 Materiais e Métodos

III.3.1 Material Vegetal

A espécie *Trifolium riograndense* foi coletada na região serrana do Rio Grande do Sul, nas proximidades do município de São Francisco de Paula, no período de floração, em novembro de 2007. A coleta foi acompanhada pelo professor Miguel Dall'Agnol, do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

O vegetal foi identificado pela botânica Sílvia Teresinha Sfoggia Miotto, do Departamento de Botânica da UFRGS. Está depositada exsicata no Herbário ICN (UFRGS) sob o número 157822.

III.3.2 Métodos

III.3.2.1 Preparação dos Extratos

Foram feitas análises quantitativas das isoflavonas genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A nas seguintes partes de *Trifolium riograndense*: raízes, estolões, folhas e flores. Cada uma das partes foi seca em estufa a 100°C por 1 hora e trituradas em um gral com auxílio de pistilo. Cada parte da planta foi analisada em triplicata.

Nesta parte do trabalho, para facilitar a quantificação e a avaliação das isoflavonas totais em *Trifolium riograndense*, as amostras foram hidrolisadas durante a extração. Pesou-se em balança analítica 10 mg de cada parte seca triturada e foi adicionado 4 mL de ácido clorídrico 50%, mantendo-se por 15 minutos em banho-maria com água fervente sob aquecimento com agitação magnética. Os extratos foram então filtrados e, posteriormente, adicionou-se 15 mL de diclorometano. Após agitação, separaram-se as frações em diclorometano, as quais tiveram o solvente eliminado por evaporador rotatório.

Os extratos concentrados obtidos foram ressuspensos em metanol (grau analítico) e colocados em balões volumétricos de 10 mL, completando-se os volumes dos balões com metanol. Estes extratos foram filtrados através de papel filtro e membrana filtrante hidrofóbica de 0,45 µm para posterior análise por CLAE, sendo que foram realizadas três determinações para cada amostra.

III.3.2.2 Análise Cromatográfica

A análise quantitativa de isoflavonas nas diferentes partes de *Trifolium riograndense* foi realizada por CLAE, conforme método desenvolvido e validado por RAMOS e colaboradores (2008). Os parâmetros da análise estão descritos na Tabela 15 e o sistema de eluição está demonstrado na Tabela 16.

Tabela 15: Parâmetros para análise quantitativa de isoflavonas em *Trifolium riograndense*

| Características | Descrição |
|-------------------------------------|--|
| Cromatógrafo | Cromatógrafo Waters Alliance 2695 |
| Detector | UV/VIS Waters 2487 |
| Coluna | Nova-Pak (R) C18 ¹ Lote: E6015A |
| Pré-coluna | Lichrospher Merck ² |
| Sistema de eluição | Gradiente |
| Fase móvel | A: Acetonitrila:Água:Ácido Trifluoroacético (20:80:0,01 - v/v/v) B: Acetonitrila:Ácido Trifluoroacético (100:0,1 - v/v) |
| Fluxo | 0,7 ml/mim |
| Volume de injeção | 10,0 µl |
| Comprimento de onda do cromatograma | 260nm |

¹ Dimensões da coluna / Tamanho de partícula: 3.9 X 150mm / 4µm

² Dimensões da pré-coluna / Preenchimento: 10X4mm / 37 - 55µm

Tabela 16: Sistema gradiente utilizado para a análise por CLAE de espécies de leguminosas

| Tempo (min) | Fase A (%) | Fase B (%) |
|-------------|------------|------------|
| 0,00 | 100 | 0 |
| 10,0 | 60 | 40 |
| 11,0 | 60 | 40 |
| 12,0 | 0 | 100 |

Foram construídas curvas-padrão para as seguintes isoflavonas de referência: daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A. As áreas abaixo das curvas de cada isoflavona presente no extrato foram determinadas e utilizadas para calcular a concentração de isoflavonas presente nas amostras. Os coeficientes de variação (CV) dos valores de área das injeções em triplicata foram calculados e, para o dado ser considerado válido, o CV devia ser menor do que 5%

III.4 Resultados e Discussão

No sistema cromatográfico utilizado, as isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A foram eluídas nos seguintes tempos de retenção: 5,646; 7,225; 8,376 e 10,327 minutos, respectivamente, conforme mostrado na Figura 8.

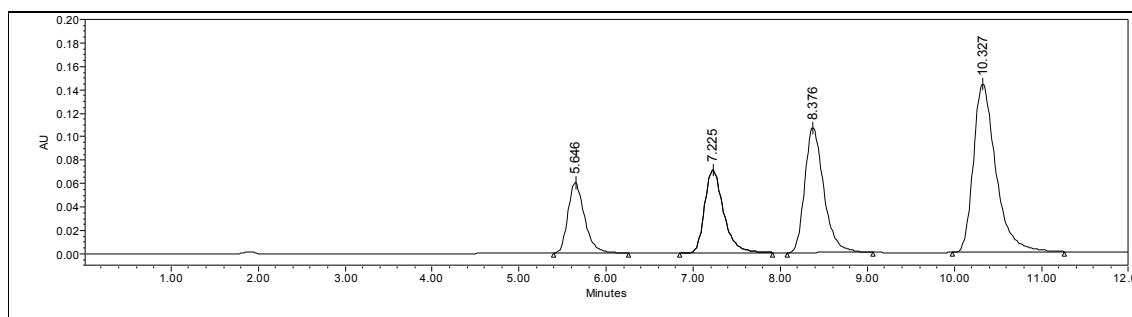


Figura 8: Cromatograma da mistura padronizada das isoflavonas de referência daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A

Na Tabela 17, estão dispostas as equações da reta e os coeficientes de correlação de cada uma das isoflavonas de referência, os quais foram utilizados para a quantificação.

Tabela 17: Equações lineares e coeficientes de correlação das isoflavonas de referência

| Isoflavona | Equação linear | Coefficiente de correlação |
|-------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| Daidzeína | $Y = 73096X + 77,183$ | 0,9983 |
| Genisteína | $Y = 99245X + 484,92$ | 0,9999 |
| Formononetina | $Y = 86207X + 17464$ | 0,9996 |
| Biochanina A | $Y = 113098X - 14451$ | 0,9997 |

A quantificação de isoflavonas totais no presente trabalho representa a concentração das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A, incluindo a forma aglicona e glicosilada de cada uma.

De acordo com a análise cromatográfica, a espécie *Trifolium riograndense* apresentou um total de 18,3 mg destas isoflavonas por grama de material vegetal seco. A aglicona majoritária foi a formononetina, com 16,683 mg/g de amostra seca, o que equivale a mais de 90% do teor total de isoflavonas analisadas na espécie. Os teores de daidzeína, genisteína e biochanina A encontrados na espécie correspondem a 0,187 mg/g; 0,223 mg/g e 1,207 mg/g, respectivamente.

A formononetina, que foi encontrada em grande quantidade em *Trifolium riograndense*, além da atividade estrogênica, que é característica a todas as isoflavonas, exibe atividade na captura de radicais livres, podendo prevenir a peroxidação lipídica (MU *et al.*, 2009). Ainda, estudos mostram que os efeitos hormonais da formononetina podem ter influência na redução do risco de câncer de mama (WANG *et al.*, 1995).

No trevo-vermelho, a isoflavona formononetina também é a aglicona majoritária, seguida da biochanina A, observando-se pequenas concentrações de daidzeína e genisteína. RAMOS e colaboradores (2008) quantificaram estas quatro isoflavonas em populações diferentes de trevo-vermelho por CLAE, encontrando de 0,008 a 0,091 mg/g amostra seca de daidzeína, 0,05 a 0,131 mg/g de amostra seca de genisteína, 6,568 a 23,462 mg/g de amostra seca de formononetina e 2,499 a 10,337 mg/g de amostra seca de biochanina A nesta espécie.

WU e colaboradores (2003) investigaram o teor de isoflavonas em outras espécies de *Trifolium* por CLAE, e foram encontradas quantidades muito pequenas de isoflavonas nessas espécies. O teor variou de 0,21 a 0,35 mg/g de isoflavonas totais em *Trifolium repens*; 0,07 a 0,40 mg/g em *Trifolium hybridum* e de 0,003 a 0,006 mg/g em *Trifolium campestre*.

Em um estudo de OLESZEK e colaboradores (2007), investigou-se a presença de isoflavonas em 57 espécies de *Trifolium*. Destas, 11 espécies se destacaram por apresentarem alta concentração de isoflavonas, com teores variando de 51 a 97 mg/g de material seco: *Trifolium lappaceum*, *Trifolium phleoides*, *Trifolium hirtum*, *Trifolium alpestre*, *Trifolium medium*, *Trifolium subterraneum*, *Trifolium heldreichianum*, *Trifolium pratense*, *Trifolium isodon*, *Trifolium miegeanum* e *Trifolium scabrum*. Em 22 espécies, não foi possível detectar a presença de isoflavonas. As outras espécies analisadas apresentavam baixos teores.

Em 1982, BLANCO e colaboradores utilizaram um método espectrofotométrico para quantificação de isoflavonas em 20 espécies de trevo. Por este método, encontraram níveis consideráveis de isoflavonas nas espécies *Trifolium subterraneum*, *Trifolium lallaceum*, *Trifolium scabrum* e *Trifolium bocconeii*. As outras espécies analisadas apresentaram pequenas concentrações.

ZGÓRKA (2009) analisou a concentração de isoflavonas em 10 diferentes espécies de *Trifolium* através de uma técnica micropreparativa de extração em fase sólida. De acordo com seus resultados, nos trevos que possuíam flores brancas, rosas ou roxas (*Trifolium alpestre*, *Trifolium arvense*, *Trifolium hybridum*, *Trifolium medium*, *Trifolium montanum*, *Trifolium pannonicum*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Trifolium resupinatum* e *Trifolium rubens*) os teores de isoflavonas variaram entre 3 e 3300 µg/g de amostra seca, enquanto que nas espécies com flores amarelas (*Trifolium aureum*, *Trifolium dubium* e *Trifolium campestre*) não foram detectados compostos isoflavônicos.

Trifolium riograndense apresenta flores de cor rosa, portanto, a ocorrência de isoflavonas nesta espécie concorda com o apontamento feito por ZGÓRKA (2009).

Esta variância nas concentrações de isoflavonas em diferentes espécies de *Trifolium* significa que espécies deste gênero, apesar de estarem circunscritas taxonomicamente, podem apresentar diferentes teores de isoflavonas. Conforme CHAMP (2002), a concentração e a composição de isoflavonas variam muito intra- e inter-espécie, dependendo também das condições edafo-climáticas. Neste sentido, ressalva-se a importância da CLAE na determinação de quais espécies e quais variedades são mais promissoras para a seleção de novas plantas ricas em isoflavonas.

Ao analisar o teor de isoflavonas nas diferentes partes de *Trifolium riograndense*, pôde-se determinar que todas as partes desta espécie apresentaram isoflavonas. A Tabela 18 mostra as quantidades de cada isoflavona nas diferentes partes da planta analisada.

Tabela 18: Quantidades de cada isoflavona (mg/g de amostra seca) em cada órgão analisado de *Trifolium riograndense*

| Isoflavona | Folha | Flor | Estolão | Raiz | TOTAIS |
|-------------------|--------------|--------------|----------------|--------------|---------------|
| Dadzeína | 0,063 | 0,059 | 0,065 | 0,000 | 0,187 |
| Genisteína | 0,167 | 0,015 | 0,033 | 0,008 | 0,223 |
| Formononetina | 6,623 | 3,180 | 4,348 | 2,532 | 16,683 |
| Biochanina A | 0,478 | 0,188 | 0,275 | 0,266 | 1,207 |
| TOTAIS | 7,331 | 3,442 | 4,721 | 2,806 | 18,300 |

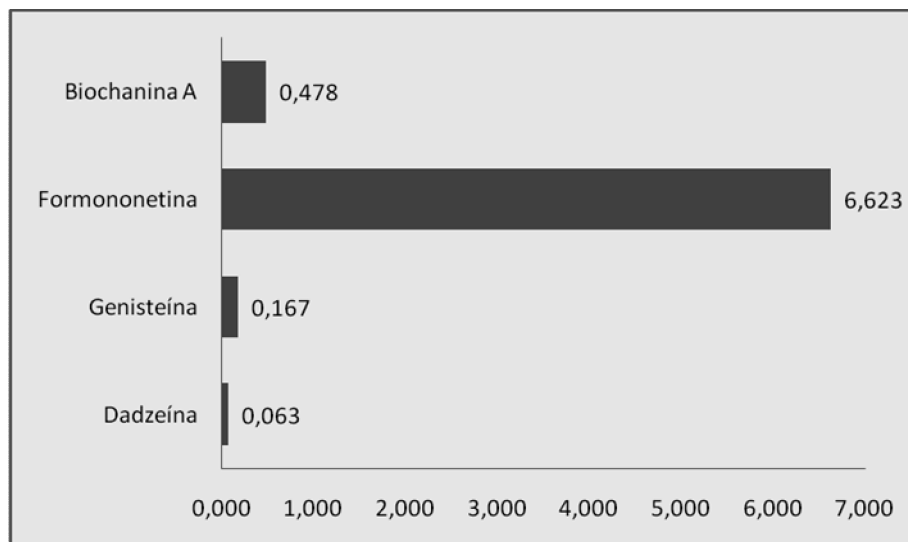
A parte vegetal que apresentou a maior quantidade de agliconas foi a folha, com 7,331 mg de isoflavonas por grama de amostra seca, seguida pelo estolão, com 4,721 mg/g; a flor, com 3,442 mg/g e a raiz, com 2,806 mg/g de isoflavonas.

Em um estudo de WU e colaboradores (2003) com quatro diferentes acessos de trevo-vermelho, as quantidades de isoflavonas foram maiores nas folhas, estolões e raízes do que nas flores, o que difere de *Trifolium riograndense*, que apresentou quantidade maior de isoflavonas nas flores do que nas raízes.

No Gráfico 1, pode ser observada a distribuição das quatro isoflavonas nas folhas de *Trifolium riograndense*. A isoflavona encontrada em maior quantidade foi a

formononetina, com 6,623 mg por grama de amostra seca, e a isoflavona em menor quantidade foi a daidzeína, com 0,063 mg por grama de amostra seca.

Gráfico 1: Quantidades de isoflavonas (mg/g de amostra seca) nas folhas de *Trifolium riograndense*



As quantidades de isoflavonas nas flores e nos estolões podem ser visualizadas nos gráficos 2 e 3. Em ambos, a formononetina foi a isoflavona presente em maior quantidade, enquanto a genisteína foi a isoflavona em menor quantidade.

Gráfico 2: Quantidades de isoflavonas (mg/g de amostra seca) nas flores de *Trifolium riograndense*

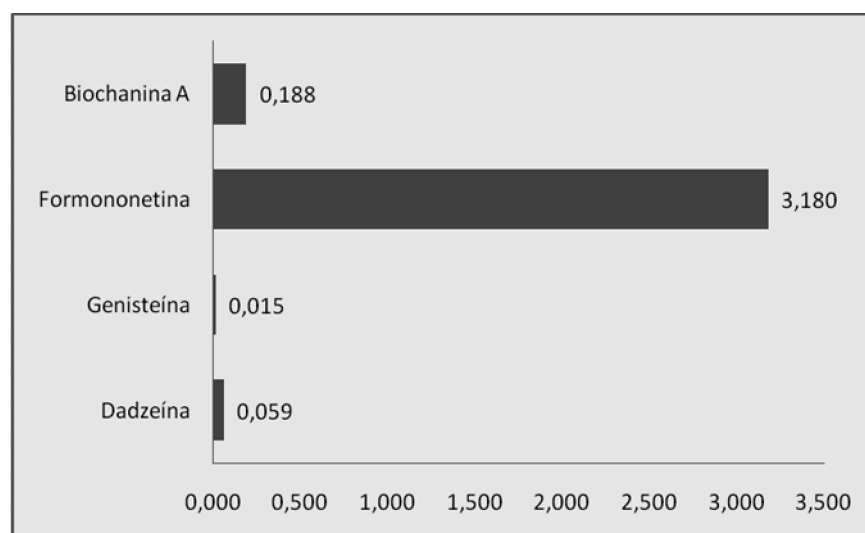
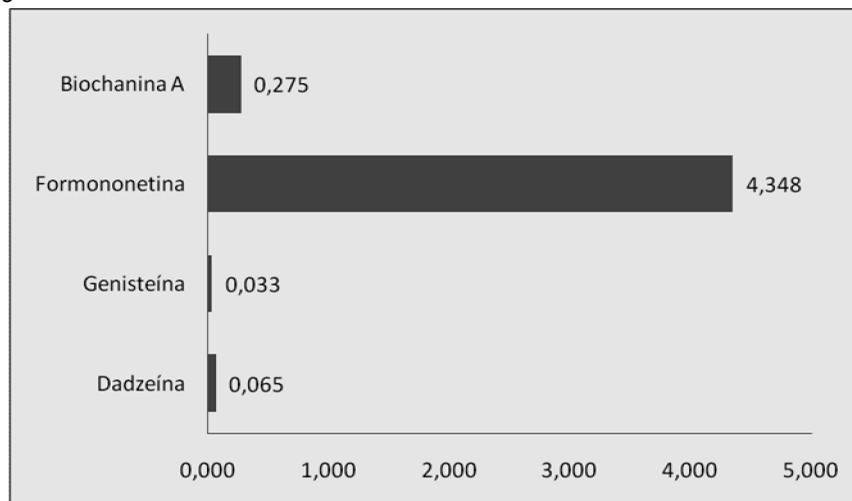
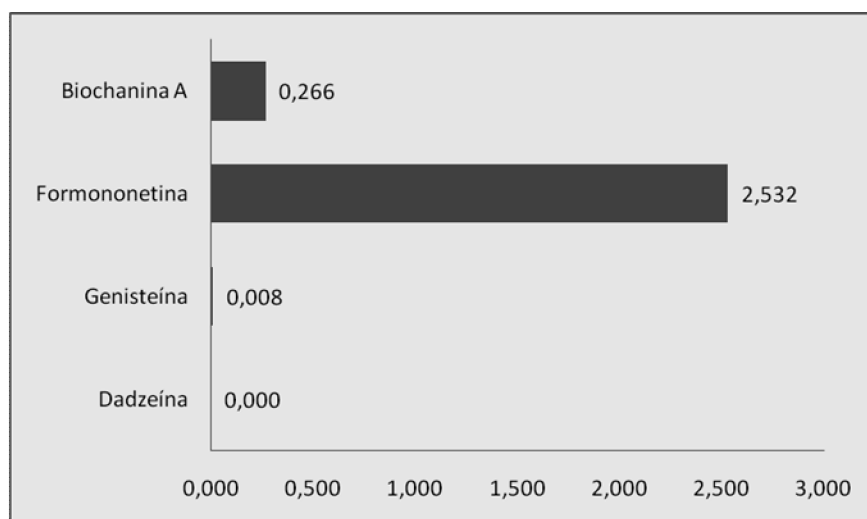


Gráfico 3: Quantidades de isoflavonas (mg/g de amostra seca) nos estolões de *Trifolium riograndense*



A raiz foi a parte do vegetal com menor quantidade de isoflavonas totais: 2,806 mg por grama de amostra seca. Na raiz, não foi detectada a isoflavona dadzeína, como pode ser verificado no gráfico 4. Já a isoflavona genisteína estava em baixíssima quantidade, com 0,008 mg por grama de amostra seca. Assim como nas folhas e nas flores, a isoflavona formononetina foi a majoritária, sendo que foram detectadas 2,532 mg desta aglicona por grama de amostra seca.

Gráfico 4: Quantidades de isoflavonas (mg/g de amostra seca) nas raízes de *Trifolium riograndense*



Devido à atenção que as isoflavonas têm atraído em função da sua atividade frente a sintomas da menopausa, doenças cardiovasculares, problemas na função cognitiva e cânceres de mama e próstata, elas estão sendo muito consumidas como suplementos alimentares nutracêuticos, assim como na forma de medicamentos fitoterápicos. O interesse crescente da presença de isoflavonas na dieta, e a sua escassez na dieta ocidental, resultam em um aumento na demanda por novas plantas fontes destes compostos. Além da soja, a única planta utilizada como fonte de isoflavonas devido ao elevado teor presente é o trevo-vermelho.

O grão de soja, que é a fonte de isoflavonas mais consumida no mundo, apresenta de 0,5 a 2,0 mg/g de isoflavonas em sua composição (BARNES, 1998). Conforme tabela do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA (2002), os derivados da soja apresentam as maiores quantidades de isoflavonas: fava de soja (0,6 – 2,39 mg/g), farinha de soja (0,6 – 2,35 mg/g), proteína de soja (4,5 – 2,39 mg/g), leite de soja (0,01 – 0,31 mg/g), *tempeh*, alimento fermentado obtido a partir de sementes de soja (0,43 - 0,63 mg/g), *tofu*, alimento obtido a partir do leite de soja (0,1 – 0,5 mg/g). O óleo de soja não contém isoflavonas.

Além da soja, inúmeros outros alimentos, pertencentes à família Leguminosae, contêm isoflavonas, porém em quantidades muito baixas. Ainda conforme tabela do USDA, a lentilha, a ervilha, o feijão-branco e o grão-de-bico apresentam uma quantidade de isoflavonas que varia de 0,001 a 0,007 mg/g.

A espécie *Trifolium riograndense* supera em muito os teores de outras espécies conhecidas, apresentando 18,3 mg/g de isoflavonas. Este resultado é relevante, visto que é uma planta nativa do Rio Grande do Sul, e que ocorre nas regiões serranas deste estado, tornando *Trifolium riograndense* uma potencial fonte comercial de isoflavonas, juntamente com o trevo-vermelho.

No entanto, estes níveis elevados de isoflavonas também apresentam implicações negativas. Há muitos relatos na literatura sobre problemas de reprodução em animais que consumiram espécies de trevo com altos teores de isoflavonas. Em 1946, BENNETTS e colaboradores descreveram anormalidades em

ovelhas alimentadas por pastagens de *Trifolium subterraneum* com altos níveis de isoflavonas. Esta síndrome, chamada de Doença do Trevo (*Clover Disease*), causava baixa taxa de natalidade e prolapsos uterinos. Com o uso de cultivares com baixo teor de isoflavonas e o aumento na proporção de gramíneas nas pastagens, as manifestações clínicas tornaram-se raras.

Em um estudo de PIMENTEL e colaboradores (1977), a espécie *Trifolium subterraneum* var. Yarloop foi diagnosticada como causa de estrogenismo em bovinos, no Rio Grande do Sul em uma pastagem composta por 95% de *Trifolium subterraneum* var. Yarloop. Os diferentes cultivares de *Trifolium subterraneum* contêm de 0,06% a 2% de formononetina. Conforme WHITTEN & PATISAUL (2001), os fitoestrógenos podem influenciar de maneira negativa os ciclos foliculares nos ovários de diferentes mamíferos, já que interagem com os receptores ER β .

Considerando que *Trifolium riograndense* contém altos teores de isoflavonas nas suas partes aéreas, devem ser evitadas pastagens com grande proporção desta espécie.

**CAPÍTULO IV – INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DO
EXTRATO DE *TRIFOLIUM RIOGRANDENSE***

IV.1 Inflamação

IV.1.1 Processo Inflamatório

O processo inflamatório é uma resposta dos organismos vivos a estímulos lesivos exógenos (agentes infecciosos, traumas físicos ou químicos) ou endógenos (imunológicos, neurológicos) com a finalidade de reconstituir a estrutura e a função do tecido ou órgão afetado (GUIDUGLI-NETO, 1997).

É uma resposta inespecífica do tecido, caracterizada por uma série de alterações que tendem a minimizar os efeitos da agressão. Essas alterações são denominadas sinais “cardinais”, sendo: rubor, calor, tumor, dor e perda da função celular (MONTENEGRO & FECCHIO, 1999). Esses sinais cardiais são conseqüências da ativação de mediadores liberados em nível local e sistêmico promovendo alterações no fluxo sangüíneo, na permeabilidade vascular, na infiltração de células e na liberação de agentes indutores da dor (ALI *et al.*, 1997).

O eritema (rubor) e a hipertermia (calor) na inflamação são conseqüências da vasodilatação e do aumento do fluxo sanguíneo na região inflamada. O edema (tumor) é provocado pelo acúmulo de exsudato, particularmente dos componentes fluidos e leucócitos; a hiperalgesia (dor) depende do acúmulo local de aminas, cininas e mediadores lipídicos que atuam sobre as terminações nervosas (VANE & BOTTING, 1996).

A inflamação aguda refere-se à resposta inicial à lesão tecidual; é mediada pela liberação de autacóides. Os inúmeros mediadores inflamatórios podem ter origem no plasma, como no caso do sistema complemento e cininas; ou serem sintetizados e liberados pelas células que migram para o local da agressão, como no caso das aminas, das citocinas e dos mediadores lipídicos (FURST & MUNSTER, 2001).

Em uma segunda fase do processo inflamatório, ocorre a ativação das células imunologicamente competentes em resposta a organismos estranhos ou

substâncias antigênicas liberadas durante a resposta inflamatória. O resultado desta resposta pode ser benéfico para o hospedeiro, quando faz com que microorganismos invasores sejam fagocitados ou neutralizados; ou deletério, se resultar em inflamação crônica sem regressão do processo subjacente (FURST & MUNSTER, 2001).

Nesta fase do processo inflamatório, os leucócitos passam a circular na periferia do vaso, o que permite forte adesão dos mesmos ao endotélio vascular. Posteriormente, passam por entre as junções endoteliais (diapedese) e migram para o local inflamado em resposta aos inúmeros mediadores do processo inflamatório. Para isso, os leucócitos são dotados de propriedades viscoelásticas que permitem a sua deformação e locomoção. A este processo que permite a migração de neutrófilos e outros leucócitos aos locais de inflamação, dá-se o nome de quimiotaxia (MONTENEGRO & FECCHIO, 1999).

Os polimorfonucleares são as células da população leucocitária que se locomovem com mais facilidade. Essa capacidade facilita o rápido acúmulo dessas células nos sítios de injúria ou infecção. Os fatores quimiotáxicos, substâncias geradas ou liberadas no foco da lesão, são os responsáveis por induzir a migração direcionada de leucócitos, conforme gradiente de concentração (ZIGMOND *et al.*, 1981; VICKER, 1989).

A inflamação crônica envolve a liberação de diversos mediadores que não são proeminentes na resposta aguda, como as interleucinas, TNF e interferons. Uma das condições mais importantes associadas a esses mediadores é a artrite reumatóide, em que a inflamação crônica produz dor e resulta em destruição do osso e da cartilagem (FURST & MUNSTER, 2001).

Quando exacerbada, a reação inflamatória pode ser potencialmente prejudicial. Nessa situação, faz-se necessário o uso de fármacos com atividade antiinflamatória, os quais irão interferir em uma ou mais etapas da cascata de eventos que caracterizam a resposta inflamatória.

IV.1.2 Antiinflamatórios

O tratamento de pacientes com inflamação tem o objetivo de retardar ou interromper o processo responsável pela lesão tecidual. A redução da inflamação pode ser possível com agentes antiinflamatórios esteróides (glicocorticóides) ou com antiinflamatórios não-esteróides (AINEs).

A ação dos AINEs se deve ao bloqueio das cicloxigenases, que são enzimas envolvidas na cascata do ácido araquidônico. Sabe-se que esta é a rota responsável pela biotransformação de importantes mediadores celulares envolvidos no processo inflamatório. Embora as cicloxigenases desempenhem importante papel nos processos inflamatórios, estas enzimas também estão presentes em vários órgãos e tecidos. Na realidade existem em duas formas de cicloxigenase: cicloxigenase 1 (COX-1), que é amplamente distribuída no organismo e cicloxigenase 2 (COX-2), que é a enzima relacionada à inflamação. A maioria dos AINEs não tem ação inibidora seletiva sobre a COX-2 e inibe, também, a COX-1. A inibição da COX-1 está diretamente relacionada à toxicidade destes antiinflamatórios, que inclui a intolerância e ulceração gastrintestinal, bloqueio da agregação plaquetária e problemas renais, entre outros. Além disso, as reações indesejáveis podem ser mediadas por mecanismos imunológicos, resultando em alergias (INSEL, 1996).

Já os glicocorticóides agem inibindo a fosfolipase A, o que reduz a síntese de prostaglandinas e leucotrienos pelo ácido araquidônico. No entanto, estes medicamentos causam reações adversas muito sérias, podendo desencadear diabetes, pressão alta, aumento de peso, retenção hídrica e problemas ósseos (ADCOCK & ITO, 2001).

IV.1.3 Atividade Antiinflamatória de Princípios Ativos de Plantas

Com o objetivo de desenvolver novos fármacos com atividade antiinflamatória e redução de efeitos colaterais, tem-se buscado matérias-primas oriundas de produtos naturais. Os metabólitos secundários derivados de plantas podem agir interferindo diretamente ou indiretamente com mediadores inflamatórios, como

metabólitos do ácido araquidônico, por exemplo. Além disso, podem interferir na produção ou ação de mensageiros secundários, ou ainda na expressão de fatores de transcrição, como NF- κ B (CALIXTO *et al.*, 2003).

Inúmeras classes de metabólitos secundários apresentam relatos de atividade antiinflamatória, podendo-se citar os terpenos, os alcalóides e os compostos fenólicos. Dentre estes, os flavonóides são os compostos com mais relatos de atividades. Conforme WILLIAMS e colaboradores (1995), a propriedade antiinflamatória dos flavonóides pode ser atribuída à habilidade de certos compostos em inibir tanto a ciclooxigenase quanto a 5-lipoxigenase na rota metabólica do ácido araquidônico. Além disso, estudos têm mostrado que flavonóides aumentam a permeabilidade capilar e exercem um efeito inibitório na exsudação de proteínas e migração de leucócitos.

Os flavonóides rutina, quercetina e hesperidina apresentaram atividade antiinflamatória em ratos, utilizando o método de inflamação induzida por carragenina. Estes compostos foram administrados intraperitonealmente, em doses diárias de 80 mg/kg (GUARDIA *et al.*, 2001).

Ginkgetina, uma biflavona de *Ginkgo biloba*, mostrou-se efetiva na inibição da fosfolipase A2 e reduziu inflamação artrítica em ratos com artrite induzida por ácido acético (KIM *et al.*, 1999).

Baicalina, um flavonóide extraído de *Scutellaria baicalensis*, apresentou inibição de edema de pata de ratos, induzido por carragenina (LIN & SHIEH, 1996). Estudos mostram que baicalina foi capaz de suprimir a produção de diversos mediadores inflamatórios (KRAKAUER *et al.*, 2001), se ligar a uma variedade de quimioquinas, limitando suas funções (LI *et al.*, 2000) e inibir a ativação de leucócitos por evitar a adesão leucocitária (SHEN *et al.*, 2003).

LIANG e colaboradores (1999) determinaram a atividade antiinflamatória de apigenina, daidzeína e canferol. Estes compostos, na dose de 15 μ M, inibiram a produção de prostaglandinas E2 em macrófagos de ratos ativados com LPS (lipopolissacarídeo de *E. coli*).

O flavonóide luteolina, quando administrado por via oral em ratos, apresentou atividade inibitória *in vivo* de fator de necrose tumoral e inibição de edema em orelha de rato induzido por ácido araquidônico (UEDA *et al.*, 2002).

VERDRENGH e colaboradores (2003) investigaram o impacto da isoflavona genisteína nas respostas celulares mediadas por células e concluíram que este composto exerce evidentes propriedades antiinflamatórias afetando granulócitos, monócitos e linfócitos.

O resveratrol, uma antocianina, inibiu tanto a enzima COX-1 como a COX-2, além de produtos gerados pela rota da lipoxigenase (ROTONDO *et al.*, 1998; MACCARRONE *et al.*, 1999). A administração oral do flavonóide cirsiolol, em camundongos, causou uma inibição dose-dependente do edema de orelha e da infiltração de leucócitos induzida por carragenina (FERRANDIZ & ALCARAZ, 1991). Os flavonóides rutina, quercetina, apigenina, galanina, morina e naringenina também inibem a expressão de COX-2 e a atividade de macrófagos (RASO *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2001).

IV.2 Métodos

IV.2.1 Preparo da Amostra

Para os ensaios de atividade antiinflamatória, a amostra utilizada foi o extrato seco obtido das folhas de *Trifolium riograndense*, em função das folhas apresentarem maior concentração de isoflavonas que as outras partes da planta.

O extrato foi obtido por maceração do material vegetal seco e triturado com etanol 40% à temperatura ambiente por um período de três dias. Após este período, o material foi filtrado, e submetido à nova maceração, até esgotamento da planta. Então, o filtrado foi extraído com diclorometano, sendo posteriormente eliminado o solvente por meio de evaporador rotatório. O extrato concentrado resultante foi

ressuspendido em quantidade suficiente de água e submetido à liofilização, obtendo-se o extrato seco.

IV.2.2 Avaliação da Atividade Antiinflamatória pelo Método de Quimiotaxia *in vitro*

Devido à quimiotaxia ser um evento importante no processo inflamatório, foram estabelecidos muitos métodos para a sua investigação. Neste trabalho, foi empregada uma das técnicas de rotina para o estudo de quimiotaxia, que é a técnica da câmara de BOYDEN (1962), modificada por ZIGMOND & HIRSCH (1973). Detalhes experimentais foram descritos previamente por MELLO e colaboradores (1992). Foram empregadas câmaras cilíndricas, construídas em acrílico transparente, consistindo de dois compartimentos (0,5 ml de capacidade cada), separados por um filtro de nitrato de celulose com 13 mm de diâmetro e poros de 8 μm de porosidade (Figura 9).

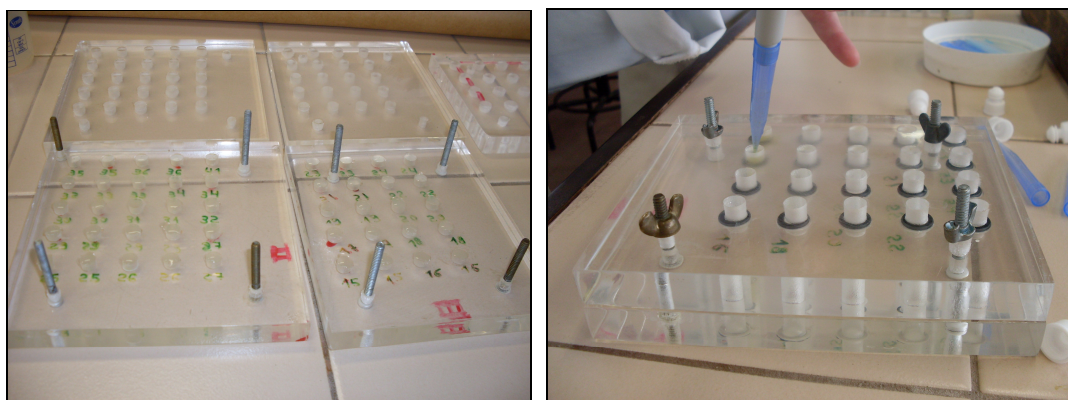


Figura 9: Placas de acrílico utilizadas para o ensaio de quimiotaxia

O compartimento inferior foi preenchido com uma solução contendo fator quimiotáxico obtido do plasma de ratos, e o compartimento superior com a suspensão de neutrófilos peritoneais. Dessa forma, pode-se avaliar a migração das células através do filtro, no gradiente de concentração do fator quimiotáxico, que se estabeleceu entre os dois compartimentos.

IV.2.2.1 Animais

Para obtenção do plasma, foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, pesando entre 180 e 220 g, provindos do Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com livre acesso à água e ração, na Unidade de Experimentação Animal da Faculdade de Farmácia – UFRGS, com temperatura a 22°C, controle de claro-escuro e umidade monitorada.

A coleta do sangue dos animais para obtenção do plasma homólogo foi feita através de guilhotinamento.

A manipulação animal foi realizada seguindo princípios éticos para a experimentação animal. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP - UFRGS), estando cadastrado sob o número 2007981. A carta de aprovação pode ser visualizada no anexo 1.

IV.2.2.2 Obtenção do Fator Quimiotático

A interação do plasma com antígenos bacterianos ativa as vias clássica e alternativa do sistema complemento, com conseqüente formação de fatores quimiotáticos para leucócitos. O material quimiotático utilizado nos experimentos foi obtido incubando-se plasma de ratos por 30 minutos a 37° C com solução de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), na concentração de 65 µg/ml. Então, o plasma foi diluído com solução de Hanks (consultar anexo 2) para a obtenção da concentração desejada de 20%.

IV.2.2.3 Coleta e Preparo de Suspensões de Leucócitos

Os neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal de um rato 4 horas após a injeção de 20 ml de uma solução de glicogênio a 1% em salina. Para a coleta das células, o animal foi sacrificado por exposição ao éter etílico. A seguir, injetou-se na cavidade peritoneal 60 ml de solução de Hanks contendo 1UI/ml de heparina.

Após coleta das células, as mesmas foram lavadas com solução de Hanks, promovendo-se, subseqüentemente, a lise de hemácias com choque hipotônico. Foram realizadas duas novas lavagens em solução de Hanks. A quantidade de células adicionada ao compartimento superior da câmara de quimiotaxia foi de $1,5 \times 10^6$ células, suspensas em 0,4 ml de solução de Hanks.

Aos leucócitos na suspensão, foi adicionado o extrato seco de *Trifolium riograndense* suspenso em Hanks, sob agitação em banho-maria a 37°C por 30 minutos, assim como as células controle (sem adição do extrato). Foram testadas as seguintes concentrações: 100 µg/ml; 50 µg/ml; 25 µg/ml; 10 µg/ml; 5 µg/ml; 1 µg/ml; 0,5 µg/ml e 0,2 µg/ml. Além disso, foram testadas as isoflavonas de referência genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A, todas na concentração de 10 µg/ml.

IV.2.2.4 Determinação da Atividade Migratória de Leucócitos

As câmaras foram preparadas em duplicata e incubadas a 37° C durante 1 hora em atmosfera úmida. Em seguida, os filtros foram removidos, fixados, corados, diafanizados *overnight* e montados entre lâmina e lamínula.

Os reagentes utilizados na coloração dos filtros são, nesta ordem:

- a) Etanol absoluto – por 5 minutos
- b) Água – por 2 minutos
- c) Solução de hematoxilina – por 1 minuto
- d) Água – por 2 minutos
- e) Solução de Tap-Water (sobrenadante de uma solução saturada de carbonato de lítio a 1% em água) – por 10 minutos
- f) Etanol 70% - por 10 minutos
- g) Etanol 95% - por 10 minutos
- h) Butanol : Etanol (4:1 – v:v) – por 10 minutos
- i) Xilol – por, no mínimo, 12 horas

A leitura dos filtros foi realizada sob microscopia óptica, utilizando-se ampliação de 40 vezes. Com o foco no plano superior do filtro, aprofundou-se o

plano de observação microscópica até que apenas duas células fossem visíveis em foco. A distância, medida em micrômetros, entre o plano superior do filtro e o dessas duas células em foco, permitiu avaliar a capacidade migratória dos neutrófilos (ZIGMOND & HIRSH, 1973).

A leitura foi realizada em cinco campos de cada filtro e o resultado expresso como a média \pm erro padrão da média (epm) e analisados estatisticamente pelo teste “t” de *Student*.

IV.2.3 Avaliação da Atividade Antiinflamatória pelo Método de Edema em Pata de Ratos

A avaliação experimental da atividade antiinflamatória pode ser realizada, preliminarmente, pela inibição do edema. A reação inflamatória desenvolvida em edema de pata de rato, com adição prévia de agente flogístico, pode ser transformada em teste quantitativo pela medida do volume da pata através de pletismômetro.

IV.2.3.1 Animais de Experimentação

Para a realização deste experimento, foram utilizados animais fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ratos da raça Wistar, machos, pesando de 180 a 200 g, foram mantidos em caixas plásticas contendo no máximo cinco animais com livre acesso a água e ração. Passaram por um período de adaptação de 72 horas no Biotério da Faculdade de Farmácia – UFRGS, com temperatura controlada (25°C), controle de claro/escuro de 12 horas e umidade monitorada.

IV.2.3.2 Método do Edema em Pata de Ratos

A atividade antiedematogênica foi avaliada de acordo com método descrito por WINTER e colaboradores (1962), na qual se utiliza para a indução do edema uma injeção de carragenina na pata dos ratos.

Foram analisados dois grupos - controle e tratado, sendo que o grupo controle foi subdividido em controle positivo e negativo. O primeiro recebeu indometacina na dose de 10 mg/kg de peso corporal via oral e o segundo, solução salina via oral. Nos animais tratados, o extrato seco obtido das folhas de *Trifolium riograndense* ressuspendido em água, foi administrado por via oral, na dose de 100 mg/kg.

Os animais foram previamente anestesiados (intraperitonealmente) com pentobarbital sódico na dose de 40 mg/kg de peso corporal. Após uma hora, o edema foi induzido pela injeção de 0,1 ml de suspensão de carragenina em solução salina (5,0 mg/ml) na aponervose subplantar da pata traseira esquerda dos ratos. As patas traseiras direitas serviram como controle, com a adição de 0,1 ml de solução salina. O volume das patas foi medido em triplicata, nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção do agente flogístico, utilizando pletismômetro. O líquido usado no aparelho foi solução contendo 4,0 ml de laurilssulfato de sódio e 0,4 g de cloreto de sódio dissolvido em um litro de água.

Os resultados de redução do edema foram calculados em relação ao aumento percentual do volume das patas traseiras de animais controle e tratados, antes e após a injeção do agente flogístico. A atividade antiedematogênica do extrato seco de *Trifolium riograndense* foi expressa como percentual da redução do edema, em relação aos grupos controles.

IV.3 Resultados e Discussão

Através do modelo de quimiotaxia, simula-se *in vitro* a migração leucocitária do espaço intravascular para o tecido (HOFBAUER *et al.*, 1998). O ensaio de quimiotaxia permite verificar a diminuição da motilidade dos leucócitos frente a agentes quimiotáticos, envolvendo o espaço percorrido pelo leucócito como medida da atividade migratória. Cabe salientar, no entanto, que a leitura da migração celular observada *in vitro* não é uma medida da distância percorrida *in vivo*.

Sabendo-se que os neutrófilos, em especial os leucócitos, desempenham um papel importante no processo inflamatório, a inibição de sua migração pode ser responsável por parte da atividade antiinflamatória.

No presente trabalho, verificou-se a inibição da migração leucocitária causada pelo extrato de *Trifolium riograndense*, sendo esta inibição significativa ($p \leq 0,005$) até a concentração de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, conforme Tabela 19. A supressão da função dos neutrófilos pode controlar a resposta inflamatória sendo aplicada como mecanismo de ação de certos fármacos antiinflamatórios (RIOJA *et al.*, 2000).

Tabela 19: Resposta quimiotática *in vitro* de neutrófilos tratados com as suspensões de extrato seco de *Trifolium riograndense* em diferentes concentrações e com as isoflavonas de referência

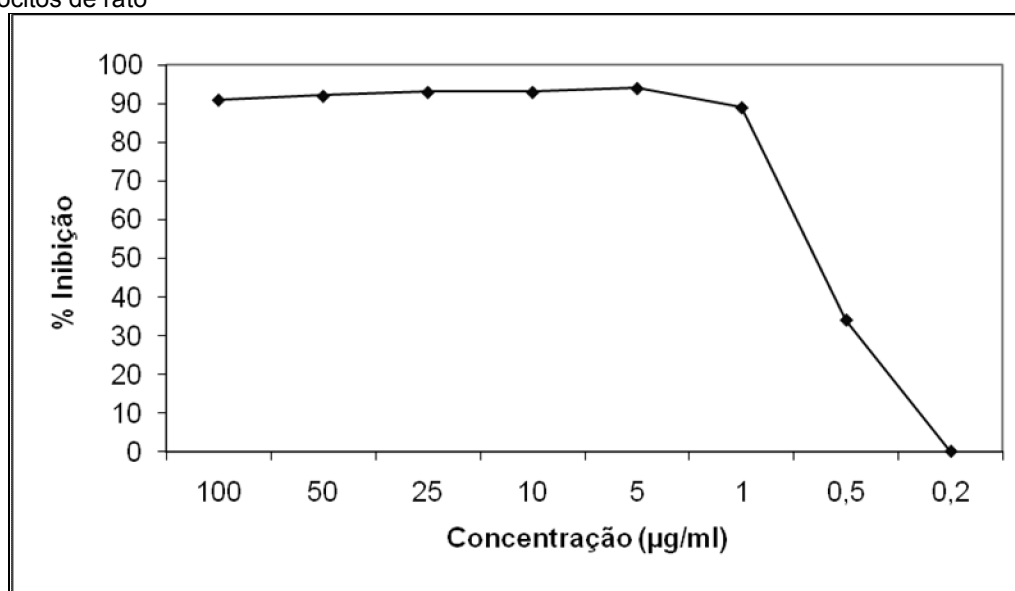
| AMOSTRA | DISTÂNCIA MIGRADA (μM) | PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO (%) |
|--|-------------------------------------|-----------------------------|
| Controle | 115 \pm 2 | 0 |
| Susp. <i>Trifolium riograndense</i> 100 $\mu\text{g/ml}$ | 10 \pm 1* | 91 |
| Susp. <i>Trifolium riograndense</i> 50 $\mu\text{g/ml}$ | 9 \pm 1* | 92 |
| Susp. <i>Trifolium riograndense</i> 25 $\mu\text{g/ml}$ | 8 \pm 1* | 93 |
| Susp. <i>Trifolium riograndense</i> 10 $\mu\text{g/ml}$ | 8 \pm 1* | 93 |
| Susp. <i>Trifolium riograndense</i> 5 $\mu\text{g/ml}$ | 7 \pm 1* | 94 |
| Susp. <i>Trifolium riograndense</i> 1 $\mu\text{g/ml}$ | 13 \pm 1* | 89 |
| Susp. <i>Trifolium riograndense</i> 0,5 $\mu\text{g/ml}$ | 76 \pm 4* | 34 |
| Susp. <i>Trifolium riograndense</i> 0,2 $\mu\text{g/ml}$ | 120 \pm 1 | 0 |
| Daidzeína 10 $\mu\text{g/ml}$ | 25 \pm 1* | 78 |
| Genisteína 10 $\mu\text{g/ml}$ | 55 \pm 3* | 52 |
| Formononetina 10 $\mu\text{g/ml}$ | 51 \pm 4* | 55 |
| Biochanina A 10 $\mu\text{g/ml}$ | 9 \pm 1* | 92 |

Os resultados da distância migrada são média \pm epm

Teste *t* de Student * $p \leq 0,005$

Conforme se observa no Gráfico 5, da concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ até a concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ de *Trifolium riograndense*, a porcentagem de inibição da atividade quimiotática foi semelhante (89 - 94%), não sendo observada diferença significativa entre os valores. Verificou-se um decréscimo na porcentagem de inibição da migração leucocitária a partir da concentração de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de *Trifolium riograndense*, sendo que na concentração de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ não foi possível observar inibição da migração de leucócitos.

Gráfico 5: Efeito de diferentes concentrações de extrato de *Trifolium riograndense* na quimiotaxia de leucócitos de rato



Nas isoflavonas de referência analisadas (daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A), verificou-se que todas elas apresentaram inibição da migração leucocitária de forma significativa. No entanto, a porcentagem de inibição causada pelo extrato de *Trifolium riograndense* foi superior às porcentagens de inibição observadas pelas isoflavonas daidzeína, genisteína e formononetina, quando avaliadas isoladamente.

SUYENAGA (2002) observou resultados diferentes ao analisar a inibição leucocitária causada pelas isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A. As isoflavonas biochanina A e formononetina não foram capazes de inibir a atividade quimiotática na concentração de 400 µM. Conforme a autora, a quimiotaxia não foi inibida pela presença de substituintes metoxilados nestas moléculas.

Este ensaio permitiu verificar a ação do extrato seco das folhas de *Trifolium riograndense* sobre os leucócitos de ratos, possibilitando observar a inibição da quimiotaxia. Esta atividade observada para o extrato desta espécie de trevo pode ser atribuída aos isoflavonóides.

Devido ao fato de que o extrato de *Trifolium riograndense* causou maior inibição na quimiotaxia de leucócitos do que as isoflavonas isoladas analisadas, pode-se supor a hipótese de sinergismo, ou seja, que a ação combinada de duas ou mais isoflavonas possa causar um efeito superior à soma dos efeitos de cada composto isolado.

Cabe salientar ainda que, além das isoflavonas quantificadas neste trabalho, outras moléculas desta classe de flavonóides podem estar presentes, contribuindo para a atividade. Portanto, torna-se necessária uma investigação química mais completa, para permitir a correlação entre as substâncias identificadas e a atividade biológica observada.

Verificou-se atividade antiedematogênica significativa nos animais tratados com extrato seco de *Trifolium riograndense* por via oral na dose de 100 mg/kg na 1ª, 2ª, 3ª e 4ª hora, sendo que a inibição máxima observada foi de 68,1% (Tabela 20).

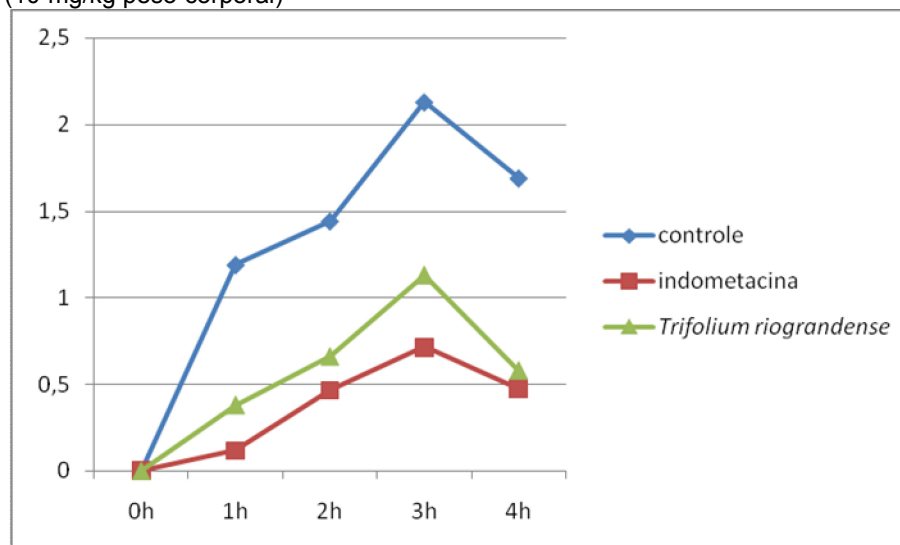
Tabela 20: Efeito da administração v.o. de *Trifolium riograndense* sobre o edema em pata de ratos induzido pela carragenina (n = 5 animais)

| Tratamento | Volume do edema de pata (ml) ± epm | | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | (% inibição) | | | |
| | 1h | 2h | 3h | 4h |
| Controle | 1,19 ± 0,15 | 1,44 ± 0,23 | 2,13 ± 0,17 | 1,69 ± 0,26 |
| Indometacina 10 mg/kg | 0,12 ± 0,23* (89,9%) | 0,47 ± 0,27* (67,4%) | 0,72 ± 0,35* (66,2%) | 0,48 ± 0,48* (71,6%) |
| <i>T. riograndense</i> 100 mg/kg | 0,38 ± 0,24* (68,1%) | 0,66 ± 0,26* (54,2%) | 1,13 ± 0,19* (46,9%) | 0,58 ± 0,26* (65,7%) |

Teste *t* de Student (*p < 0,05 em relação ao controle)

No Gráfico 6, pode ser observada uma representação da inibição do edema causada pela administração de *Trifolium riograndense*, comparando com controle negativo (solução salina) e controle positivo (indometacina).

Gráfico 6: Representação gráfica do edema de pata induzido por carragenina em ratos pré-tratados com solução salina (controle), extrato de *Trifolium riograndense* (100 mg/kg peso corporal), e indometacina (10 mg/kg peso corporal)



O edema de pata induzido por carragenina é um modelo de inflamação aguda que consiste de duas fases: a primeira, detectada em torno de uma hora, é chamada de fase rápida, com liberação de histamina e serotonina; a segunda fase é chamada de tardia, com os mediadores (cininas e prostaglandinas) liberados após duas e três horas respectivamente (VINEGAR *et al.*, 1969; DI ROSA *et al.*, 1971). Qualquer substância que iniba a ação da carragenina é considerada como tendo ação antiinflamatória.

Dentre as espécies de *Trifolium*, há relato de que a espécie *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum* apresentou atividade antiedematogênica em pata de rato, em modelo de artrite induzido (SABUDAK *et al.*, 2008).

As observações dos ensaios tomadas juntas, revelam que o extrato de *Trifolium riograndense* possui propriedade antiinflamatória. No entanto, os mecanismos celulares envolvidos por trás desta atividade merecem ser melhor estudados. Outros ensaios *in vivo* e *in vitro* são necessários para corroborar os resultados. Investigações complementares poderão, inclusive, estabelecer prováveis mecanismos de ação.

DISCUSSÃO GERAL

Nas últimas décadas, tem havido um grande interesse nos fitoestrógenos, em especial as isoflavonas, os quais se tornaram uma alternativa no controle dos sintomas relativos à menopausa. Em adição a esta atividade, estes compostos possuem diversas outras propriedades biológicas, como atividade antioxidante, inibição da atividade enzimática, entre outras, proporcionando potenciais benefícios controle de muitas doenças crônicas.

Sabe-se que a ocorrência de isoflavonas está restrita para espécies da família Leguminosae, salvo raras exceções. Este aspecto quimiotaxonômico é altamente relevante, pois limita a pesquisa destes compostos em espécies com maior possibilidade de contê-los. Isto amplia a chance de descoberta de novos compostos isoflavônicos (ou de novas plantas fontes de isoflavonas já conhecidas) quando comparado com a pesquisa em plantas ao acaso.

A detecção da presença de isoflavonas em espécies de Leguminosae tem muitas implicações. As espécies com altos teores de isoflavonas tornam-se interessantes fontes destas substâncias, podendo ser utilizadas na indústria de suplementos alimentares, já que uma dieta rica nestes compostos pode auxiliar na prevenção de doenças crônicas. Ainda, o elevado teor de isoflavonas torna estas plantas propícias para serem empregadas na área farmacêutica, sendo utilizadas para redução dos sintomas pós-menopausa. Neste caso, há necessidade de outros estudos complementares, como por exemplo, análises de toxicidade. Extratos de isoflavonas de soja e trevo-vermelho já são comercializados para este fim.

Já as espécies de leguminosae com ausência ou baixos teores de isoflavonas são indicadas para o emprego como plantas forrageiras, sem alterar negativamente a fisiologia e a reprodução dos animais.

O presente estudo investigou a presença das isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A, que já tiveram diversas atividades biológicas comprovadas cientificamente, em 153 espécies de Leguminosae nativas da Região Sul do Brasil. Destas, 42 espécies apresentaram ao menos uma das isoflavonas investigadas. Estas espécies são novas fontes potenciais de isoflavonas para industrialização.

Com isso, novas linhas de pesquisa surgem, e muitos novos estudos tornam-se necessários, com os objetivos de esclarecer diversas variáveis, como qual parte da planta produz maior quantidade destes compostos, qual época do ano é a mais favorável para encontrar altos teores de isoflavonas, quais fatores naturais auxiliam ou prejudicam a planta na produção de isoflavonas, se existe uma forma de melhorar a planta geneticamente para produzir mais isoflavonas, entre outros.

Todas as 42 espécies que apresentaram ao menos uma das quatro isoflavonas investigadas pertencem à subfamília Faboideae (Papilionoideae). As espécies analisadas das subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae não apresentaram isoflavonas, confirmando VEITCH (2007), que relatou que a ocorrência restrita de isoflavonóides na subfamília Faboideae é um aspecto químico notável nas leguminosas. Isto enfatiza a importância dos isoflavonóides como caracteres de diagnóstico químico para a subfamília Faboideae.

Desta forma, o presente trabalho determinou que as espécies de leguminosas nativas da Região Sul do Brasil (a maioria até então sem estudos de identificação de isoflavonas) obedecem esta premissa de que os isoflavonóides ocorram apenas em espécies da subfamília Faboideae.

De todas as espécies nativas investigadas, apenas a espécie *Trifolium riograndense* continha as quatro isoflavonas. Considerando que esta espécie nativa é do mesmo gênero do exótico trevo-vermelho (*Trifolium pratense*), considerou-se interessante estudar a espécie de trevo nativa do Rio Grande do Sul, a fim de comparar com a espécie exótica, que já é inclusive comercializada como fonte de isoflavonas.

Trifolium riograndense apresentou elevados teores de isoflavonas. Somando as quatro isoflavonas quantificadas, a espécie apresentou um total de 18,3 mg de isoflavonas por grama de amostra seca analisada, o que é considerável, quando comparado com outras plantas fontes de isoflavonas. Todas as partes da planta apresentaram isoflavonas, no entanto, a parte da planta com maior concentração é a folha, com 7,331 mg por grama.

As espécies do gênero *Trifolium* são leguminosas nativas com bom potencial forrageiro. Este gênero é considerado um dos mais importantes da estação hiberna, tanto pela qualidade como pela quantidade de forragem produzida nesta estação. O gênero *Trifolium* é também especialmente interessante em função da sua tolerância a solos ácidos e ricos em alumínio.

A espécie *Trifolium riograndense* vem sendo estudada há alguns anos em relação ao seu melhoramento genético, com o objetivo de aprimorar a qualidade e rendimento na produção, para posterior utilização desta planta como forrageira adaptada e produtiva nas condições do Rio Grande do Sul. Os altos níveis de isoflavonas encontrados em *Trifolium riograndense* no presente trabalho devem servir de alerta para técnicos e produtores, para tomar medidas de manejo, evitando o pastoreio contínuo de fêmeas destinadas à reprodução, pois ainda não se sabe o real impacto que o teor elevado de isoflavonas em *Trifolium riograndense* causa aos animais.

As isoflavonas presentes em *Trifolium riograndense* em grande quantidade sugeriram alguns ensaios biológicos. Considerando que os flavonóides em geral apresentam atividade antiinflamatória, o extrato das folhas de *Trifolium riograndense* foi submetido a dois ensaios. Um destes avaliou a atividade migratória de leucócitos tratados com extrato de *Trifolium riograndense* frente a agentes quimiotáticos, enquanto outro determinou a atividade antiedematogênica do extrato de *Trifolium riograndense* pelo método do edema em pata de rato. Em ambos os ensaios, o extrato de *Trifolium riograndense* apresentou atividade significativa.

Este resultado mostra que esta espécie de trevo, nativa do Rio Grande do Sul, apresenta um grande potencial como fitoterápico, visto que além das atividades estrogênicas e preventivas de doenças crônicas, ainda apresenta uma relevante atividade antiinflamatória. Logicamente, mais estudos devem ser realizados, tanto para corroborar estes resultados, quanto para determinar outros fatores envolvidos na transformação de uma planta medicinal em medicamento fitoterápico, como definição de dose diária e toxicidade, por exemplo.

Como no climatério o sistema imune das mulheres fica levemente comprometido, o fato de uma planta que contém isoflavonas apresentar atividade antiinflamatória é muito relevante, pois além da melhora dos sintomas relativos à deficiência estrogênica, ainda atua nos possíveis casos de inflamação que a mulher na menopausa tende a apresentar.

Avaliando como um todo, este trabalho apresentou resultados importantes, permitindo a detecção da presença das isoflavonas investigadas em muitas espécies de leguminosas nativas do sul do Brasil, a determinação de altos teores de isoflavonas na espécie *Trifolium riograndense*, além de atribuir atividades antiinflamatórias a esta espécie, que também é nativa da região sul. Estes resultados mostram que estas espécies possuem um enorme potencial científico e econômico para o Rio Grande do Sul e o Brasil.

CONCLUSÕES

- Um total de 42 espécies de Leguminosas apresentou ao menos uma das quatro isoflavonas investigadas, sendo que todas eram da subfamília Faboideae.

- Não foi possível observar correlação entre a presença das quatro isoflavonas e a distribuição taxonômica das espécies.

- A espécie *Trifolium riograndense* apresenta 0,187 mg de daidzeína; 0,223 mg de genisteína; 16,683 mg de formononetina e 1,207 mg de biochanina A, por grama de amostra seca.

- A parte da planta com maior concentração de isoflavonas foi a folha, com 7,331 mg de isoflavonas por grama de amostra. Já a raiz foi a parte com menor teor de isoflavonas.

- O extrato seco das folhas de *Trifolium riograndense* causou inibição da migração leucocitária de forma significativa nas concentrações de 100 µg/ml; 50 µg/ml; 25 µg/ml; 10 µg/ml; 5 µg/ml; 1 µg/ml e 0,5 µg/ml.

- O extrato seco das folhas de *Trifolium riograndense*, na dose de 100 mg/kg, apresentou efeito antiedematogênico nas 1ª, 2ª, 3ª e 4ª horas após a administração de carragenina, no ensaio de indução de edema.

REFERÊNCIAS

ADCOCK, I. M.; ITO, K. Molecular mechanisms of corticosteroid actions. **Monaldi Archives for Chest Disease**, v. 55, p. 256 - 266, 2001.

ALDRIGHI, J. M.; ALDRIGHI, C. M. S.; ALDRIGHI, A. P. S. Alterações sistêmicas do climatério. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 59, p. 15 – 21, 2002.

ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R. M.; SNYDERMAN, R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. **Medical Clinics of North America**, v. 81, n. 1, p. 1 - 28, 1997.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 10 de março de 2009.

APEL, M. A. **Óleos voláteis de espécies da subtribo Eugeniinae (Myrtaceae): Composição química e atividades antimicrobiana e antiinflamatória.** Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2001, 292p. Tese (Doutorando).

ARJMANDI, B. H.; GETLINGER, M. J.; GOYAL, N. V.; ALEKEL, L.; HASLER, C. M.; JUMA, S.; DRUM, M. L.; HOLLIS, B. W.; KUKREJA, S. C. Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 1358S – 1363S, 1998.

ATKINSON, C.; COMPSTON, J. E.; DAY, N. E.; DOWSETT, M.; BINGHAM, S. A. The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 326 - 333, 2004.

BARNES, S. Evolution of the health benefits of soy isoflavones. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 217, p. 386 – 392, 1998.

BARRETO, I. L.; KAPPEL, A. Principais espécies de gramíneas e leguminosas das pastagens naturais do Rio Grande do Sul. **Anais do XV Congresso da Sociedade Botânica do Brasil**, p. 281 - 294, 1964.

BECK, V.; ROHR, U.; JUNGBAUER, A. Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 94, p. 499 – 518, 2005.

BENNETTS, H. W.; UNDERWOOD, E. J.; SHIER, F. L. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. **Australian Veterinary Journal**, p. 2 – 12, v. 22, n. 2, 1946.

BLANCO, M. M.; LUCENA, E. P.; CASTRO, A. G. G. Isoflavonas estrogenica en especies espontaneas del genero *Trifolium*. **Archivos de zootecnia**, v. 31, n. 121, p. 269 – 280, 1982.

BOOTH, N. L.; PIERSEN, C. E. Red clover (*Trifolium pratense*). **Encyclopedia of Dietary Supplements**, New York: Ed. Marcel Dekker, 2005.

BORCHERS A. T.; KEEN C. L.; STERN J. S.; GERSHWIN M. E. Inflammation and Native American medicine : the role of botanicals. **The American journal of clinical nutrition**, v. 72, n. 2, p. 339 - 347, 2000.

BOSSEMEYER, R. Aspectos gerais do climatério. In: FERNANDES, C. E.; MELO, N. R.; WEHBA, S. **Climatério Feminino: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Lemos Editorial, p. 17 – 33, 1999.

BOYDEN, S. The chemotatic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 15, p. 453 - 466, 1962.

BRANDI, M. L. Natural and syntetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. **Calcified Tissue International**, v. 61, p.1S - 8S, 1997.

BRUNEAU, A.; FOREST, F.; HERENDEEN, P. S.; KLITGAARD, B. B.; LEWIS, G. P. Phylogenetic Relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as Inferred from Chloroplast *trnL* Intron Sequences. **Systematic Botany**, v. 26, n. 3, p. 487 – 514, 2001.

BURKART, A. *Trifolium* L. In: **Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina)**, v. 6, n. 3, Buenos Aires: I.N.T.A., p. 219 - 662, 1987.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). **Planta Medica**, v. 69, p. 973 – 983, 2003.

CHACKO, B. K.; CHANDLER, R. T.; MUNDHEKAR, A.; KHOO, N.; PRUITT, H. M.; KUCIK, D. F.; PARKS, D. A.; KEVIL, C. G.; BARNES, S.; PATEL, R. P. Revealing

anti-inflammatory mechanisms of soy isoflavones by flow: modulation of leukocyte endothelial cell interactions. **American Journal of Physiology and Heart Circulation Physiology**, v. 289, p. H908 – H915, 2005.

CHAMP, M. M. Non-nutrient bioactive substances of pulses. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. s307 - s319, 2002.

CHANG, L. C.; GERHÄUSER, C.; SONG, L.; FARNSWORTH, N. R.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Activity-guided isolation of constituents of *Tephrosia purpurea* with the potential to induce the phase II enzyme, quinone reductase. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 9, p. 869 – 873, 1997.

CHEN, Y. C.; SHEN, S. C.; LEE, W. R.; HOU, W. C.; YANG, L. L.; LEE, T. J. F. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophage. **Journal of Cell Biochemistry**, v. 82, p. 537 – 548, 2001.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. Bronx: The New York Botanical Garden, 1988.

DANZ, H.; BAUMANN, D.; HAMBURGER, M. Quantitative determination of the dual COX-2/5-LOX inhibitor tryptanthrin in *Isatis tinctoria* by ESI-LC-MS. **Planta Medica**, v. 68, p. 152 – 157, 2002.

DE LORENZI, D. R. S.; BARACAT, E. C. Climatério e qualidade de vida. **Femina**, v. 33, n. 12, p. 903 – 909, 2005.

DE LORENZI, D. R. S.; DANELON, C.; SACILOTO, B.; PADILHA JR., I. Fatores indicadores da sintomatologia climatérica. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 1, p. 7 – 11, 2005.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of Pathology**, v. 104, n. 1, p. 15 – 29, 1971.

DIJSSELBLOEM, N.; BERGHE, W. V.; NAEYER, A. D.; HAEGEMAN, G. Soy isoflavone phyto-pharmaceuticals in interleukin-6 affections Multi-purpose nutraceuticals at the crossroad of hormone replacement, anti-cancer and anti-inflammatory therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 1171 - 1185, 2004.

DIXON, R. A.; STEELE, C. L. Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 394 - 400, 1999.

EVANS, A. M. Clovers. In: Simmonds, N. W. **Evolution of Crop Plants**. London: Longman, 1976, 339 p.

FARIA, S. M.; LIMA, H. C.; CARVALHO, A. M.; GONÇALVES, V. F.; SPRENT, J. I. Occurrence of nodulation in legume species from Bahia, Minas Gerais and Espírito Santo States of Brazil. In: **Advances in Legume Systematics**. 5. The Nitrogen Factor. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 17 – 23, 1994.

FAY, M. F.; DALE, P. J. Condensed tannins in *Trifolium* species and their significance for taxonomy and plant breeding. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 40, n. 1, p. 7 - 13, 1993.

FERRANDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents Actions**, v. 32, p. 283 – 288, 1991.

FIGUEIREDO, R.; RODRIGUES, A. I.; COSTA, M. C. Volatile composition of red clover (*Trifolium pratense* L.) forages in Portugal: The influence of ripening stage and ensilage. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1445 – 1453, 2007.

FURST, D. E.; MUNSTER, T. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, disease modifying antirheumatic drugs, nonopioid analgesics & drugs used in gout. In: KATZUNG, B. G (ed.) **Basic & Clinical Pharmacology**, 8^a ed., New York: McGraw Hill, p. 596 – 616, 2001.

GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; GRATACAP, M. P.; TULLIEZ, J.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. **General Pharmacology**, v. 32, p. 279 - 286, 1999.

GIGLIO, T.; IMRO, M. A.; FILACI, G.; SCUDELETTI, M.; PUPPO, F.; DE CECCO, L.; INDIVERI, F.; COSTANTINI, S. Immune cell circulating subsets are affected by gonadal function. **Life Sciences**, v. 54, n. 18, p. 1305 – 1312, 1994.

GOMES, C. M. R.; GOTTLIEB, O. R.; GOTTLIEB, R. G.; SALATINO, A. Phytochemistry in perspective; Chemosystematics of the Papilionoideae, p. 465-488 in: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. **Advances in Legume Systematics. Part 2**. Royal Botanic Gardens, 1981.

GOMEZ, F.; CALDERON, J. S.; QUIJANO, L.; DOMINGUEZ, M.; RIOS, T. Viridiflorin, an isoflavone from *Tephrosia viridiflora*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 5, p. 1126 - 1128, 1985.

GUCHU, S. M.; YENESEW, A.; TSANUO, M. K.; GIKONYO, N. K.; PICKETT, J. A.; HOOPER, A. M.; HASSANALI, A. C-methylated and C-prenylated isoflavonoids from root extract of *Desmodium uncinatum*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 5, p. 646 - 651, 2007.

GUIDUGLI-NETO J. Inflamação. In: GUIDUGLI-NETO, J. **Elementos de patologia geral**. São Paulo: Livraria Santos Editora, p. 63 - 91, 1997.

GUKOVSKI, I.; REYES, C. N.; VAQUERO, E. C.; GUKOVSKAYA, A. S.; PANDOL, S. J. Curcumin ameliorates ethanol and nonethanol experimental pancreatitis. **American Journal of Physiology (Gastrointestinal Liver Physiology)**, v. 284, p. G85 - G95, 2003.

HALL, I. H.; STARNES JR, C. O.; LEE, K. H.; WADDELL, T. G. Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 5, p. 537 - 543, 1980.

HALLBERG, L.; ROSSANDER-HULTÉN, L.; BRUNE, M.; GLEERUP, A. Calcium and iron absorption: mechanism of action and nutritional importance. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 46, p. 317 - 327, 1992.

HAN, K. K.; SOARES JUNIOR, J. M.; HAIDAR, M. A.; LIMA, G. R.; BARACAT, E. C. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. **Obstetrics and Gynecology**, v. 99, n. 3, p. 389 - 394, 2002.

HARIDAS, V.; HIGUCHI, M.; JAYATILAKE, G. S.; BAILEY, D.; MUJOO, K.; BLAKE, M. E.; ARNTZEN, C. J.; GUTTERMAN, J. U. Avicins: triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 5821 - 5826, 2001.

HE, X.; LIN, L.; LIAN, L. Analysis of flavonoids from red clover by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 755, p. 127 - 132, 1996.

HEGNAUER, R. Phytochemistry and plant taxonomy – An essay on the chemotaxonomy of higher plants. **Phytochemistry**, v. 25, p. 1519 - 1535, 1986.

HOFBAUER, R.; MOSER, D.; SALFINGER, H.; FRASS, M.; KAPIOTIS, S. Sufentanil inhibits migration of human leukocytes through human endothelial cell monolayers. **Anesthesia & Analgesia**, v. 87, p. 1181 - 1185, 1998.

HUTCHINSON, J. **The genera of flowering plants. Dicotyledones. vol. I**, London: Oxford University, 1964, 516p.

ILYAS, M.; KAMIL, M.; PARVEEN, M.; KHAN, M. S. Isoflavones from *Garcinia nervosa*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 3, p. 807 - 809, 1994.

INGHAM, J. L. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v. 43, Wien/New York: Springer, 1983. 266p.

INSEL, P. A. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. IN: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R.W; GOODMAN, G. A. (eds). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**, 9^a ed. New York: McGraw-Hill, p. 617 – 657, 1996.

IZAGUIRRE, P. **Especies Indígenas y Subespontáneas del Género *Trifolium* L. (Leguminosae) en el Uruguay**. Serie Técnica n. 58. Uruguay: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, 1995, 22p.

IZAGUIRRE, P.; BEYHAUT, R. **Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Part I. Papilionoideae**. Montevideo: Ed. Hemisferio Sur, 1999, 549p.

IZAGUIRRE, P.; BEYHAUT, R. **Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte 2: Caesalpinioideae. Parte 3: Mimosoideae**. Montevideo: Ed. Hemisferio Sur, 2003, 301p.

JERI, A. R. The use of an isoflavone supplement to relieve hot flushes. **The Female Patient**, v. 27, p. 34 - 37, 2002.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**, 11 ed. São Paulo: Editora Nacional, 1993, 777p.

KANG, S. A.; JANG, K. H.; CHO, Y.; HONG, K. H.; KONG, S. H.; CHOUE, R. W. High performance liquid chromatographic analysis of isoflavones in soybean and blackbean. **Journal of Asian Regional Association for Home Economics**, v. 8, n. 1, p. 44 – 48, 2001.

KAOUADJI, M.; AGBAN, A.; MARIOTTE, A.; TISSUT, M. Lonchocarpene, a Stilbene, and Lonchocarpusone, an Isoflavone: Two New Pyranopolyphenols from *Lonchocarpus nicou* Roots. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 2, p. 281 – 285, 1986.

KAPPEL, A. **Os trevos; espécies do gênero *Trifolium***. Porto Alegre: Secretaria do Estado do Rio Grande do Sul – DPA- DZ. Secretaria do Estado do Rio Grande do Sul – DPADZ. Boletim Técnico n. 9, 1967, 48p.

KAUFMAN, P. B.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H.; BOIK, J.; HOYT, J. E. A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 3, n. 1, p. 7 - 12, 1997.

KIM, Y. P.; LEE, E. B.; KIM, S. Y.; LI, D.; BAN, H. S.; LIM, S. S.; SHIN, K. H.; OHUCHI, K. Inhibition of prostaglandin E2 production by platycodin D isolated from the root of *Platycodon grandiflorum*. **Planta Medica**, v. 67, n. 4, p. 362 – 364, 2001a.

KIM, D. S.; PARK, S. Y.; KIM, J. K.; Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from beta (1-42) insult. **Neuroscience Letters**, v. 303, p. 57 - 61, 2001b.

KIM, H. K.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S.; KIM, H. P. Inhibition of rat adjuvant-induced arthritis by ginkgetin, a biflavone from ginkgo biloba leaves. **Planta Medica**, v. 65, p. 465 – 467, 1999.

KLEJDUS, B.; VITAMVÁSOVÁ-STERBOVÁ, D.; KUBÁN, V. Identification of isoflavone jugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 450, p. 81 - 97, 2001.

KNIGHT, D. C.; EDEN, J. A. A review of the clinical effects of phytoestrogens. **Obstetrics and Gynecology**, v. 87, p. 897 - 904, 1996.

KRAKAUER, T.; LI, B. Q.; YOUNG, H. A. The flavonoid baicalin inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines. **FEBS Letters**, v. 500, n. 1, p. 52 – 55, 2001.

KRENN, L.; UNTERRIEDER, I.; RUPRECHTER, R. Quantification of isoflavones in red clover by HPLC. **Journal of Chromatography B**, v. 777, p. 123 - 128, 2002.

KROYER, G. T. Red clover extract as antioxidant active and functional food ingredient. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 5, p. 101 - 105, 2004.

KUIPER, G. G. J. M.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; VAN DER SAAG, P. T. Interaction of estrogenic chemical and phytoestrogens with estrogen receptor β . **Endocrinology**, v. 139, p. 4252 – 4263, 1998.

LEPHART, E. D.; WEST, T. W.; WEBER, K. S.; RHEES, R. W.; SETCHELL, K. D.; ADLERCREUTZ, H.; LUND, T. D. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 24, p. 5 – 16, 2002.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. 577p.

LI, B. Q.; FU, T.; GONG, W. H.; DUNLOP, N.; KUNG, H. F.; WANG, J. M. The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. **Immunopharmacology**, v. 49, n. 3, p. 295 – 306, 2000.

LIANG, Y. C.; HUANG, Y. T.; TSAI, S. H.; LIN-SHIAU, S. Y.; CHEN, C. F.; LIN, J. K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 10, p. 1945 – 1952, 1999.

LIN, L.; HE, X.; LINDENMAIER, M.; YANG, J.; CLEARY, M.; QIU, S.; CORDELL, G. A. LC-ESI-MS Study of the flavonoid glycoside malonates of red clover (*Trifolium pratense*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 354 - 365, 2000.

LIN, C. C.; SHIEH, D. E. The anti-inflammatory activity of *Scutellaria rivularis* extracts and its active components, baicalin, baicalein and wogonin. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 24, n. 1, p 31 – 36, 1996.

LUCASIN JR., R.; LIMA, W. L. Osteoporose: exercício como prevenção e tratamento. **Arcsvrandi: A Revista da Clínica Médica**, p. 28 - 36, 1994.

LUSTOSA, A. B., GIRAO, M. J. B. C., SARTORI, M. G. F. *et al.* Urinary and Vaginal Cytology of Postmenopausal Women with Oral and Transdermal Estrogen Replacement. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, n. 9, p. 573 - 577, 2002.

MACCARRONE, M.; LORENZON, T.; GUERRIERI, P.; AGRO, A. F. Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 265, p. 27 - 34, 1999.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. G. A.; SALES, B. H. L. N.; MAGALHÃES, E. G. Twenty-three flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1459 - 1471, 1996.

MARTIN, S.; PADILLA, E.; OCETE, M. A.; GALVEZ, J.; JIMENEZ, J.; ZARZUELO, A. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum fruticosum*. **Planta Medica**, v. 59, n. 6, p. 533 - 536, 1993.

MEDEIROS, S. F.; OLIVEIRA, V. N.; YAMAMOTO, M. M. W. Epidemiologia clínica do climatério. **Reprodução & Climatério**, v. 18, n.1, p. 79 - 86, 2003.

MEDEIROS, S. F.; MEDEIROS, M. M. W. Y.; OLIVEIRA, V. N. Climacteric complaints among very low-income women from a tropical region of Brazil. **São Paulo Medical Journal**, v. 124, n. 4, p. 214 - 218, 2006.

MELLO, S. B. V.; FARSKY, S. H. P.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Inhibition of neutrophil chemotaxis and chemokinesis associated with plasma protein in aging rats: selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattractants. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 51, p. 46 - 52, 1992.

MOHAMED, K. M.; OHTANI, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Oleanene glycosides from seeds of *Trifolium alexandrinum*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1237 - 1242, 1995.

MONTENEGRO, M. R.; FECCHIO, D. Inflamações: Conceitos gerais e inflamação aguda, in: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**. São Paulo: Atheneu, p. 109 - 128, 1999.

MOON, T.C.; MURAKAMI, M.; KUDO, I.; SON, K. H.; KIM, H. P.; KANG, S. S.; CHANG, H. W. A new class of Cox-2 inhibitor, rutaecarpine from *Evoida rutaecarpa*. **Inflammation Research**, v. 48, p. 621 - 625, 1999.

MORABITO, N.; CRISAFULLI, A.; VERGARA, C.; GAUDIO, A.; LASCO, A.; FRISINA, N.; D'ANNA, R.; CORRADO, F.; PIZZOLO, M. A.; CINCOTTA, M.; ALTAVILLA, D.; IENTILE, R.; SQUADRITO, F. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebocontrolled study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, p. 1904 - 1912, 2002.

MORAES, C. O. C.; PAIM, N. R.; NABINGER, C. Avaliação de leguminosas do gênero *Trifolium* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 24, n. 7, p. 813 - 818, 1989.

MU, H.; BAY, Y. H.; WANG, S. T.; ZHU, Z. M.; ZHANG, Y. W. Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover). **Phytomedicine**, v. 16, n. 4, p. 314 - 319, 2009.

MURTHY, M. S. R.; RAO, E. V. Maxima isoflavone J: a new o-prenylated isoflavone from *Tephrosia maxima*. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 6, p. 967 - 968, 1985.

NAVARRO, P. A. A. S.; GOMES, F. M.; AZEVEDO, G. D.; COSTA, F. S.; FERRIANI, R. A.; IANNETTA, O. Fatores locais envolvidos na etiopatogênese da osteoporose pós-menopausa. **Reprodução e Climatério**, n. 16, p. 167 - 172, 2001.

OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of *Trifolium* species. **Phytochemistry**, v. 61, p. 165 - 170, 2002.

OLESZEK, W.; STOCHMAL, A.; JANDA, B. Concentration of isoflavones and other phenolics in the aerial parts of *Trifolium* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8095 - 8100, 2007.

OLSEN, N. J.; KOVACS, W. J. Gonadal steroids and immunity. **Endocrine Review**, v. 17, n. 4, p. 369 - 384, 1996.

OPPERMANN-LISBÔA, K.; WANNMACHER, L. Reposição hormonal na menopausa: benefícios e riscos. **Reprodução e Climatério**, n. 16, p. 11 - 19, 2001.

PAECH, K.; WEBB, P.; KUIPPER, G. G. J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A.; KUSHNER, P. J.; SCANLAN, T. S. Differential ligand activation of estrogen receptors ER and ER β at API sites. **Science**, v. 277, p. 1508 - 1510, 1997.

PARDINI, D. Menopausal hormone therapy. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, n. 6, p. 938 – 942, 2007.

PENG, Y. Y.; YE, J. N. Determination of isoflavones in red clover by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Fitoterapia**, v. 77, p. 171 – 178, 2006.

PIMENTEL, C. A.; BROD, C. L. G.; PIMENTEL, S. M.; MEDEIROS, E. L.; BENTO, C. L.; MONKS, P. Hiperestrogenismo causado por fitoestrógenos em novilhas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Reproducao Animal**, v. 1, p. 15 - 20, 1977.

PONCE, M. A.; SCERVINO, J. M.; ERRA-BALSELLS, R.; OCAMPO, J. A., GODEAS, A. M. Flavonoids from shoots and roots of *Trifolium repens* (white clover) grown in presence or absence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1925 – 1930, 2004.

POLHILL, R. M. Papilionoideae. In: POLHILL, R. M. & RAVEN, P. H. eds. **Advances in Legume Systematics. Part I**, Kew: Royal Botanic Gardens. p. 191 - 208, 1981.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. **Advances in Legume Systematics - Part 1**, Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. 425p.

PONGPRAYOON, U.; TUCHINDA, P.; CLAESON, P.; SEMATONG, T. Topical antiinflammatory activity of the major lipophilic constituents of the rhizome of *Zingiber cassumunar*. Part 1. The essential oil. **Phytomedicine**, v. 3, p. 319 - 322, 1997.

POPE, G. S.; ELCOATE, P. V.; SIMPSON, S. A.; ANDREWS D. G. Isolation of an oestrogenic isoflavone (biochanin A) from red clover. **Chemical Industry**, v. 10, p. 1092, 1953.

PRASAD, Y. R.; CHAKRADHAR, V. A New Isoflavone from *Indigofera linnaei*. **Indian Journal of Chemistry**, v. 43, n. 8, p. 1807 - 1808, 2004.

PRATI, S.; BARAVELLI, V.; FABBRI, D.; SCHWARZINGER, C.; BRANDOLINI, V.; MAIETTI, A.; TEDESCHI, P.; BENVENUTI, S.; MACCHIA, M.; MAROTTI, I.; BONETTI, A.; CATIZONE, P.; DINELLI, G. Composition and content of seed

flavonoids in forage and grain legume crops. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 4, p. 491 - 501, 2007.

RAMOS, G. P.; DIAS, P. M. B.; MORAIS, C. B.; FROEHLICH, P. E.; DALL'AGNOL, M.; ZUANAZZI, J. A. S. LC determination of four isoflavone aglycones in red clover (*Trifolium pratense* L.). **Chromatographia (Wiesbaden)**, v. 67, p. 125 - 129, 2008.

RASO, G. M.; MELI, R.; DI CARLO, G.; PACILIO, M.; DI CARLO, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774.1A. **Life Science**, v. 68, p. 921 – 931, 2001.

REINLI, K.; BLOCK, G. Phytoestrogen content of foods: A compendium of literature values. **Nutrition and Cancer**, v. 26, p. 123 – 148, 1996.

REN, M. Q.; KUHN, G.; WEGNER, J.; CHEN, J. Isoflavones, substances with multi-biological and clinical properties. **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 135 - 146, 2001.

RINGBOM, T.; SEGURA, L.; NOREEN, Y.; PERERA, P.; BOHLIN, L. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1212 – 1215, 1998.

RINGBOM, T.; HUSS, U.; STENHOLM, A. FLOCK, S.; SKATEBØLL, L.; PERERA, P.; BOHLIN, L. Cox-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 745 - 749, 2001.

RIOJA, I.; UBEDA, A.; TERCENIO, M. C.; GUILLEN, I.; RIGUERA, R.; QUINTELA, J. M.; PEINADOR, C.; GONZALEZ, L. M.; ALCARAZ, M. J. An anti-inflammatory ditriazine inhibiting leukocyte functions and expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2. **European Journal of Pharmacology**, v. 397, p. 207- 217, 2000.

ROHLF, F. J. **NTSYS. Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.10, Exeter software, Setauket, New York, 2001.

ROTONDO, S.; RAJTAR, G.; MANARINI, S.; CELARDO, A.; ROTILLO, D.; DE GAETANO, G.; EVANGELISTA, V.; CERLETTI, C. Effect of *transresveratrol*, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, p. 1691 - 1699, 1998.

SABUDAK, T.; DOKMECI, D.; OZYIGIT, F.; ISIK, E.; AYDOGDU, N. Antiinflammatory and antioxidant activities of *Trifolium resupinatum* var. *microcephalum* extracts in arthritic rats. **Asian Journal of Chemistry**, v. 20, p. 1491 – 1496, 2008.

SABUDAK, T.; OZTURK, M.; GOREN, A. C.; KOLAK, U.; TOPCU, G. Fatty acids and other lipid composition of five *Trifolium* species with antioxidant activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 2, p. 137 - 141, 2009.

SAEED, S. A.; SIMJEE, K. U.; MAHMOOD, F.; RAHMAN, N. N. Dual inhibition of platelet-activating factor and arachidonic acid metabolism by ajmaline and effect on carrageenan-induced rat paw oedema. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, p. 715 - 719, 1993.

SAFAYHI, H.; SAILER, E. R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. **Planta Medica**, v. 63, n. 6, p. 487 – 493, 1997.

SAKAMOTO, S.; KOFUJI, S.; KUROYANAGI, M.; UENO, A.; SEKITA, S. Saponins from *Trifolium repens*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1773 - 1777, 1992.

SCHULTZ, Z. Estrogen-effective isoflavones in *Trifolium pratense* (red clover). Distribution in superterranean parts of plants and occurrence as "bound" isoflavones. **Deutsch Tierarztl Wochenschr**, v. 72, n. 11, p. 246 - 251, 1965.

SCHUMAKER, S. A.; LEGAULT, C.; RAPP, S. R.; THAL, L.; WALLACE, R. B.; OCKENE, J. K.; HENDRIX, S. L.; JONES, B. N.; ASSAF, A. R.; JACKSON, R. D.; MORLEY KOTCHEN, J.; WASSERTHEIL-SMOLLER, S.; WACTAWSKI-WENDE, J. Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: The Womens Health Initiative memory study: A randomized controlled trial. **JAMA-Express**, v. 289, n. 20, p. 2651 - 2662, 2003.

SETCHELL, K. D. Absorption and metabolism of soy isoflavones – from food to dietary supplements and adults to infants. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 654S - 655S, 2000.

SETCHELL, K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology and implications for human health of soy isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 1333S - 1346S, 1998.

SHAFIULLAH, M.; PARVEEN, M.; KAMIL, M.; ILLYAS, M. A new isoflavone C-glycoside from *Cassia siamea*. **Fitoterapia**, v. 65, p. 339 – 341, 1995.

SHEEHAN, M.; WONG, H. R.; HAKE, P. W.; MALHOTRA, V.; O'CONNOR, M.; ZINGARELLI, B. Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor- κ B pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. **Molecular Pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 953 - 963, 2002.

SHEN, Y. C.; CHIOU, W. F.; CHOU, Y. C.; CHEN, C. F. Mechanisms in mediating the anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 465, n. 1-2, p. 171 – 181, 2003.

SHERTZER, H. G.; PUGA, A.; CHANG, C.; SMITH, P.; NEBERT, D. W.; SETCHELL, K. D.; DALTON, T. P. Inhibition of CYP1A1 enzyme activity in mouse hepatoma cell culture by soybean isoflavones. **Chemico-Biological Interactions**, v. 123, n. 1, p. 31 - 49, 1999.

SIVESIND, E.; SEGUIN, P. Effects of the environment, cultivar, maturity, and preservation method on Red Clover isoflavone concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6397 - 6402, 2005.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3- 4, p. 375 - 383, 2000.

SOUZA FILHO, P. A. C. **Estudo químico e biológico em *Lupinus lanatus* Bentham (Leguminosae – Faboideae)**. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2004, 116 p. Dissertação (Mestrado).

SU, Y., WANG, Y., YANG, J. Flavonoid compounds of snowbellleaf tickclover (*Desmodium styracifolium*). **Chinese Traditional Herbal Drugs**, v. 24, p. 343 – 344, 1993.

SUMNER, L. W.; PAIVA, N. L.; DIXON, R. A.; GENO, P. W. High-performance liquid chromatography/continuous-flow liquid secondary ion mass spectrometry of flavonoid glycosides in leguminous plant extracts. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 31, p. 472 - 485, 1996.

SUYENAGA, E. S. **Avaliação da atividade antiinflamatória de flavonóides por ensaios *in vivo* e *in vitro***. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências

Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2002, 238 p. Tese (Doutorado).

TAHARA, S.; ORIHARA, S.; INGHAM, J.L.; MIZUTANI, J. Seventeen isoflavonoids from *Lupinus albus* roots. **Phytochemistry**, v. 28, p. 901 – 911, 1989.

TAHARA, S.; IBRAHIM, R. K. Prenylated isoflavonoids – An update. **Phytochemistry**, v. 8, n. 5, p. 1073 - 1094, 1995.

TEMPFER, C. B.; BENTZ, E.; LEODOLTER, S.; TSCHERNE, G.; REUSS, F.; CROSS, H. S.; HUBER, J. C. Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 6, p. 1243 - 1249, 2007.

TOSTES, J. B. F.; SILVA, A. J. R.; PARENTE, J. P. Isofavone glycosides from *Centrosema pubescens*. **Phytochemistry**, v. 50, ed. 6, p. 1087 - 1090, 1999.

TOSTES, J. B. F.; SILVA, A. J. R.; PARENTE, J. P. Pubescidin, an isoflavone glycoside from *Centrosema pubescens*. **Phytochemistry**, v. 45, ed. 5, p. 1069 - 1072, 1997.

TUCKER, S. C. Evolutionary implications of floral ontogeny in legumes. In: STIRTON, C.H.; ZARUCCHI, J.L. [eds.], Advances in legume biology, **Missouri Botanical Gardens Monograph in Systematic Botany**, v. 29, p. 59 – 76, 1989.

UEDA, H.; YAMAZAKI, C.; YAMAZAKI, M. Luteolin as an Anti-inflammatory and Anti-allergic Constituent of *Perilla frutescens*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 9, p. 1197 – 1202, 2002.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, Agricultural Research Service & Iowa State University. **USDA-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods**, Release 1.3, 2002. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>. Acesso em 15 de abril de 2009.

USUI, T. Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. **Endocrine Journal**, v. 53, ed. 1, p. 7 - 20, 2006.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Scandinavian Journal of Rheumatology**. Supl. 102, p. 9 - 21, 1996.

VEITCH, N. C. Isoflavonoids of the Leguminosae. **Natural Products Reproduction**, v. 24, p. 417 – 464, 2007.

VERDRENGH, M.; JONSSON, I. M.; HOLMDAHL, R.; TARKOWSKI, A. Genistein as an anti-inflammatory agent. **Inflammation Research**, v. 52, ed. 8, p. 341 - 346, 2003.

VETTER, J. Isoflavones in Different Parts of Common *Trifolium* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 106 - 108, 1995.

VICKER, M. G. Gradient and temporal signal perception in chemotaxis. **Journal of Cell Science**, v. 92, n. 1, p. 1 – 4, 1989.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 166, n. 1, p. 96 – 103, 1969.

VOIGT, L. F; WEISS, N. S.; CHU, J.; DALING, J. R.; MCKNIGHT, B.; VAN BELLE, G. Progestagen supplementation of exogenous oestrogens and risk of endometrial cancer. **Lancet**, v. 338, p. 274 - 277, 1991.

WANG, S.; GHISALBERTI, E.; RIDSDILL-SMITH, J. Volatiles from *Trifolium* as feeding deterrents of reglegged earth mites. **Phytochemistry**, v. 52, p. 601 - 605, 1999.

WANG, W.; HIGUCHI, C. M.; ZHANG, R. Individual and combinatory effects of soy isoflavones on the “in vitro” potentiation of lymphocyte activation. **Nutrition and Cancer**, v. 29, p. 29 - 34, 1997.

WANG, W.; TANAKA, Y.; HAN, Z.; HIGUCHI, C. M. Proliferative response of mammary glandular tissue to formononetin. **Nutrition and Cancer**, v. 23, n. 2, p. 131 - 140, 1995.

WATANABE, S.; TERASHIMA, K.; SATO, Y.; ARAI, S.; EBOSHIDA, A. Effects of isoflavone supplement on healthy women. **Biofactors**, v. 12, p. 233 - 241, 2000.

WHITTEN, P. L., PATISAUL, H. B. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. **Environmental Health Perspectives**, Supl. 109, p. 5 – 20, 2001.

WILLIAMS, C. N.; HONET, J. R. S.; HARBONE, J. B.; GREENHAM, J.; EAGLES, J. A biologically active lipophilic flavonols from *Tanacetum parthenium*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 267 – 270, 1995.

WINK, M.; MEIBNER, C.; WITTE, L. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of genus *Lupinus*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 139 – 153, 1995.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carragenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 244 - 247, 1962.

WOLFF, L. P. G. **Avaliação do endométrio em mulheres menopausadas após a utilização de isoflavonas**. Brasil: Universidade Estadual de Campinas, 2005. Dissertação de Mestrado.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Research on the menopause in the 1990's**. Geneva: WHO, 1996 (WHO Technical Report Series: 866).

WU, Q.; WANG, M.; SIMON, J. E. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1016, n. 2, p. 195 - 209, 2003.

WUTTKE, W.; JARRY, H.; WESTPHALEN, S.; CHRISTOFFEL, V.; SEIDLOVÁ-WUTTKE, D. Phytoestrogens for hormone replacement therapy? **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 83, p. 133 - 147, 2003.

YOKOSUKA, A.; HARAGUCHI, M.; USUI, T.; KAZAMI, S.; OSADA, H.; YAMORI, T.; MIMAKI, Y. Glaziovianin A, a new isoflavone, from the leaves of *Ateleia glazioviana* and its cytotoxic activity against human cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 3091 – 3094, 2007.

ZAND, S. R.; JENKINS, D. J.; DIAMANDIS, E. P. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 62, p. 35 - 49, 2000.

ZGÓRKA, G. Ultrasound-assisted solid-phase extraction coupled with photodiode-array and fluorescence detection for chemotaxonomy of isoflavone phytoestrogens in *Trifolium* L. (Clover) species. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 965 – 972, 2009.

ZHANG, Y.; SONG, T. T.; CUNNICK, J. E.; MURPHY, P. A.; HENDRICH, S. Daidzein and genistein glucuronides “in vitro” are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. **The Journal of Nutrition**, v. 129, p. 399 - 405, 1999.

ZIGMOND, S. H.; LEVITSKI, H. I.; KREEL, B. J. Cell polarity: an examination of its behavioral expression and its consequences for polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. **The Journal of Cell Biology**, v. 89, p. 585 - 592, 1981.




ZIGMOND, S. H.; HIRSCH, J. G. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. **Journal of Experimental Medicine**, v. 137, p. 387 - 410, 1973.

ZOHARY, M.; HELLER, D. **The genus *Trifolium***. Jerusalem: The Israel Academy of Sciences and Humanities, 1984. 606 p.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 577 - 614, 2003.

ZUANAZZI, J. A. S.; CLERGEOT, P. H.; QUIRION, J. C.; HUSSON, H. P.; KONDOROSI, A.; RATET, P. Production of *Sinorhizobium meliloti* nod gene activator and repressor flavonoids from *Medicago sativa* roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, p. 784 – 794, 1998.

ANEXO 1: Carta de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS

| | | | |
|--|--|---|--------------------|
|  | PRÓ-REITORIA DE PESQUISA COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA CARTA DE APROVAÇÃO |  | |
| <p>O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:</p> | | | |
| Número : | 2007981 | | |
| Título : | Investigação de isoflavonas em espécies de Leguminosas nativas do sul do Brasil, com ênfase em <i>Trifolium riograndense</i> Burkart | | |
| <u>Pesquisador (es) :</u> | | | |
| <u>NOME</u> | <u>PARTICIPAÇÃO</u> | <u>EMAIL</u> | <u>FONE</u> |
| JOSE ANGELO SILVEIRA ZUANAZZI | PESQ RESPONSÁVEL | zuanazzi@farmacia.ufrgs.br | 33085090 |
| ELFRIDES EVA SCHERMAN SCHAPOVAL | PESQUISADOR | 00001341@ufrgs.br | 33085218 |
| GREICE RAQUEL GOERCK | PESQUISADOR | 00164132@ufrgs.br | |
| MIGUEL DALL AGNOL | PESQUISADOR | migueld@ufrgs.br | 33087413 |
| SILVIA TERESINHA SFOGGIA MIOTTO | PESQUISADOR | stsmiotto@bol.com.br | 33087676 |
| <p>O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 46 , ata nº 126 , de 19/3/2009 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.</p> | | | |
| <p>Porto Alegre, segunda-feira, 23 de março de 2009</p> | | | |
|  ILMA SIMONI BRUM DA SILVA Coordenador do CEP-UFRGS | | | |
| <hr/> | | | |
| segunda-feira, 23 de março de 2009 | Página 4 de 9 | | |

ANEXO 2: Forma de preparo da solução salina de Hanks

Solução estoque

| | |
|--|--------|
| NaCl | 40,0 g |
| KCl | 2,0 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 0,5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 g |
| Água q.s.p. | 500 ml |

Solução Tris 1 M

| | |
|------------|---------|
| Tris | 121 g |
| Água | 1000 ml |

Acerta-se o pH a 7,3 com HCl

Solução de CaCl₂ (1,1 M)

| | |
|-------------------------|--------|
| CaCl ₂ | 12 g |
| Água | 100 ml |

Solução de MgSO₄

| | |
|--|--------|
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 9,9 g |
| Água | 100 ml |

No momento da utilização

| | |
|---|---------|
| Solução estoque | 100 ml |
| Solução Tris 1 M | 2,75 ml |
| Solução de CaCl ₂ (1,1 M)..... | 170 µl |
| Solução de MgSO ₄ | 200 µl |
| Água q.s.p. | 1000 ml |

Acerta-se o pH em 7,35 com HCl 0,1 N e adiciona-se 220 mg de dextrose

ANEXO 3: Artigo submetido para publicação na revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Isoflavones in different parts of *Trifolium riograndense* Burkart (Leguminosae)

Greice Raquel Dettenborn¹; Grazielle Pereira Ramos¹; Cláudia Borges de Morais¹; Paula Casagrande Ceolato¹; Miguel Dall'Agnol²; José Ângelo Silveira Zuanazzi^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, CEP 90.610-000, Porto Alegre (RS), Brazil;

² Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91.501-970, Porto Alegre (RS), Brazil;

* Telephone number: + 55 51 33085450; FAX: 55 51 33085437

* E-mail address: zuanazzi@farmacia.ufrgs.br

ABSTRACT

An HPLC method was used for determination and quantification of four isoflavones (genistein, daidzein, formononetin and biochanin A) from leaf, flower, stolon and root of *Trifolium riograndense*. The results showed that this species contains high amounts of isoflavones. Each plant organ presented different concentrations of the examined isoflavones. The highest amount of isoflavones was found in the leaves of the plant, and the root presented the lowest total concentration of isoflavones. The major isoflavone found in all parts of the plant was formononetin. *Trifolium riograndense* could be an option of isoflavone source for food supplement industry.

KEYWORDS: Isoflavones, *Trifolium riograndense*, clover, HPLC

INTRODUCTION

Isoflavones, a class of phytoestrogens, are plant metabolites structurally similar to steroidal estrogens. These compounds have received widespread attention as potential therapeutic agents, particularly in women's health. They have estrogenic activity and have been associated with prevention of breast and prostate cancer (1) in addition to cardiovascular disease (2). Isoflavones are also of interest because of their biological activity in farm animals. Cows and ewes fed with estrogenic forage may suffer from problems related to the reproductive area. The most important side effects are temporary or permanent sterility, impaired ovarian function, often accompanied by reduced conception rates and increased embryonic loss, and uterine prolapses (3).

Isoflavones have a distinct taxonomical distribution because their occurrence is related mainly with the Leguminosae (or Fabaceae) family. *Trifolium* taxon is one of the most important genera of the Leguminosae family, due to the agricultural value and the number of species (about 300) (4).

Most quantification analyses of isoflavones concentration and biological activities described in literature were performed with *Trifolium pratense* L. (red clover). This species contains related isoflavone glycosides, mainly of the genins formononetin and biochanin A, besides smaller amounts of daidzein and genistein glycosides (5). In previous literature, there is no report of chemical studies on *Trifolium riograndense* Burkart. It is a native species of clover from southern Brazil,

especially from the northern region of Rio Grande do Sul. *Trifolium riograndense* is an herbaceous perennial plant, growing to 50 cm high. The leaves are trifoliolate (with three leaflets) and the flowers are dark pink. This clover blooms at spring, and it is cold resistant. *Trifolium riograndense* is especially interesting to forage plant breeders because of its tolerance to acid and aluminium-rich soils (6).

The aim of this work was to quantify the isoflavone aglycones daidzein, formononetin, genistein and biochanin A (Fig. 1) in different organs of *Trifolium riograndense* (leaf, stolon, flower and root).

EXPERIMENTAL

Chemicals and Reagents

Daidzein and genistein were purchased from Sigma (St. Louis, USA); formononetin and biochanin A were purchased from Fluka (Steinheim, Germany). Acetonitrile (HPLC grade) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and trifluoroacetic acid (analytical grade) was obtained from Nuclear (Diadema, Brasil) All other chemicals were analytical grade.

Plant material

Trifolium riograndense Burk. was collected in the flowering phase, on November 2007, in several cities from the northern region of Rio Grande do Sul, Brazil, such as São Francisco de Paula, Bom Jesus, Lajeado Grande, Alziro Ramos, Tainhas and Várzea do Cedro. Voucher specimens were deposited at the Herbarium in the ICN Herbarium, UFRGS, Porto Alegre, Brazil (number 157822). The leaves, stolons, flowers and roots of the gathered plants were separated. The samples were

dried in an oven at 100 °C for 1 h, and then the plant material was ground using a mortar and pestle.

Preparation of the Extracts for HPLC Analyses

Each sample was prepared and analyzed in triplicate. Ten mg of pulverized plant were extracted with 4 ml of 6 M HCl and incubated at 100 °C for 15 min in water bath under magnetic stirring. After cooling, the residue was filtrated and extracted with 15 ml of dichloromethane (3 times). The extract was concentrated under reduced pressure, dissolved in methanol and transferred to a 10 ml volumetric flask that was filled up with methanol. The extract was filtrated by a 0.45 µm membrane before the HPLC injection

HPLC Analyses of Extracts for Isoflavone Content

The HPLC analyses were performed according Ramos *et al.* (7), on a Waters Alliance 2695 chromatograph with an UV detector (UV/VIS Waters 2487). The system was equipped with a C18 reverse-phase column (Nova-Pak, 4µm, 3.9 x 150 mm) with guard-column and operated at room temperature. Elution of isoflavones was performed using a linear gradient system, and the mobile phase consisted of acetonitrile:water:trifluoroacetic acid (20:80:0.01; v/v/v) (A) and acetonitrile:trifluoroacetic acid (100:0.1; v/v) (B). The gradient profile was: 0-10 min from 0 to 40% B, 10-11 min 40% B, 11-12 min from 40 to 100% B. At the end of each running, 6 min of 100% A was used to restore the initial conditions. The flow-rate was 0.7 ml/min. The detection wavelength was 260 nm.

Standard curves were generated for the four isoflavones (daidzein, formononetin, genistein and biochanin A). The area under the curve for each

isoflavone of the extract was determined, and these areas were used to calculate the percent weight of isoflavones of the samples, based on standard curve, linear regression and amount injected onto the column. Relative standard deviations (RSDs) for area values from triplicate injections were calculated as $[(\text{mean} - \text{standard deviation})/\text{mean}] \times 100$, and the samples RSDs had to be $< 5\%$ to be considered valid data.

RESULTS AND DISCUSSION

In this HPLC system, daidzein, genistein, formononetin and biochanin A were eluted with the following retention time ranges: 5.646, 7.225, 8.376 and 10.327 minutes, respectively. R^2 values for the least-squares regression equations fitted to the standard curves were as follow: daidzein (0.9983), genistein (0.9999), formononetin (0.9996) and biochanin A (0.9997).

The concentrations of the four investigated isoflavones in different parts from *Trifolium riograndense* are summarized in Table 1.

The total isoflavone concentration in *Trifolium riograndense* was 18.300 mg/g of dry plant. In leaves the total isoflavone concentration was 7.331 mg/g of dry plant. The root presented the lowest isoflavone concentration, 2.806 mg/g. The major isoflavone found in all parts of the plant was formononetin.

The isoflavone concentration found in *Trifolium riograndense* is high when compared with other species of Leguminosae family. Soy seeds, the isoflavone most consumed source in the world, present from 0.5 to 2.0 mg/g of isoflavones (8).

Previous researches have quantified isoflavones in other *Trifolium* species. Ramos *et al.* (7) analysed five populations of red clover (*Trifolium pratense*), and the

aglycone contents varied from 0.008-0.091 mg/g of daidzein, 0.05-0.131 mg/g of genistein, 6.568-23.462 mg/g of formononetin, and 2.499-10.337 mg/g of biochanin A. In general, the daidzein and genistein contents of *Trifolium riograndense* are higher than *Trifolium pratense*, while the concentration of biochanin A in *Trifolium riograndense* is lower.

A screening of 57 *Trifolium* species for isoflavone concentration showed that there are a number of species with extremely high amounts of these compounds. From this point of view, the species *Trifolium lappaceum*, *Trifolium phleoides*, *Trifolium hirtum*, *Trifolium alpestre*, *Trifolium medium*, *Trifolium subterraneum*, *Trifolium heldreichianum*, *Trifolium pratense*, *Trifolium isodon*, *Trifolium miegeanum* and *Trifolium scabrum* are interesting, ranging from 10.39 to 88.38 mg/g of isoflavones. Most of the other 46 *Trifolium* species were either free of isoflavones, or presented very low content (9).

Some *Trifolium* species show low concentration of isoflavones. Wu *et al.* (10) determined the isoflavone content in *Trifolium repens*, *Trifolium hybridum* and *Trifolium campestre*. The total isoflavones in different parts of these species were found in much lower concentrations: 0.21-0.35 mg/g in *Trifolium repens*, 0.07-0.40 mg/g in *Trifolium hybridum* and 0.003-0.006 mg/g *Trifolium campestre*.

Isoflavones have attracted attention due to their role in the amelioration of postmenopausal symptoms, activities related to cardiovascular diseases, cognitive function, and breast and prostate cancers (11). Isoflavone-based nutraceuticals are the most assayed polyphenol supplements. The interest in isoflavones as dietary components and their scarcity in Western diets as compared to the Asian diet, where they are abundant due to soy consumption, has resulted in increasing demand for new plant sources of these compounds.

These results showed that *Trifolium riograndense* is a plant rich in isoflavone, and a new interesting option as isoflavone source.

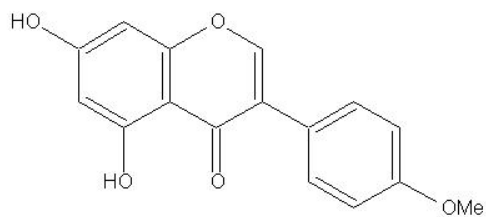
LITERATURE CITED

1. Shertzer HG, Puga A, Chang C, Smith P, Nebert DW, Setchell KD, Dalton TP. Inhibition of CYP1A1 enzyme activity in mouse hepatoma cell culture by soybean isoflavones. *Chem Biol Interact* 1999; 123: 31-49.
2. Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL. Soybean isoflavones improve cardiovascular risks factors affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr* 1996; 126: 43-50.
3. Adams NR. Permanent infertility in ewes exposed to plant estrogens. *Aust Vet J* 1990; 67: 197-201.
4. Zohary M, Heller D. *The genus Trifolium*. The Israel Academy of Sciences and Humanities: Jerusalem, 1984. 606 p.
5. He X, Lin L, Lian L. Analysis of flavonoids from red clover by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1996; 755:127-132.
6. Burkart, A. *Trifolium* L. In: *Flora Illustrada de Entre Rios (Argentina)*. I.N.T.A: Argentina, 1987, v. 6, n. 3, pp. 219-662.
7. Ramos GP, Dias PMB, Morais CB, Froehlich PE, Dall'Agnol M, Zuanazzi JAS. LC determination of four isoflavone aglycones in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Cromatogr* 2008; 67: 125-129.

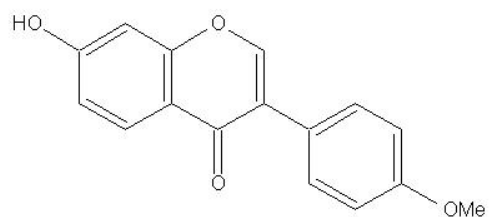
8. USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, Agricultural Research Service & Iowa State University. *USDA-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods*, Release 1.3, 2002.
9. Oleszek W, Stochmal A, Janda B. Concentration of isoflavones and other phenolics in the aerial parts of *Trifolium* species. *J Agric Food Chem* 2007; 55(20): 8095–8100.
10. Wu Q, Wang M, Simon JE. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 2003, 1016: 195-209.
11. Verheus M, van Gils CH, Keinan-Boker L, Grace PB, Bingham SA, Peeters PHM. Plasma phytoestrogen and subsequent breast cancer risk. *J Clin Oncol* 2007; 25: 648–655.

Table 1 – Isoflavone contents (Milligram per Gram of Dry Weight; Arithmetic Means of the Analytical Data are Given; Number of Triplicates: 3) in Different Parts of *Trifolium riograndense*

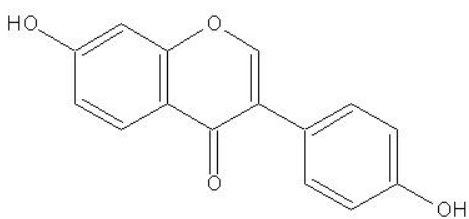
| Plant organ | Isoflavones | | | | Total |
|-------------|-------------|-----------|--------------|-------------|--------|
| | Daidzein | Genistein | Formononetin | Biochanin A | |
| Leaf | 0.063 | 0.167 | 6.623 | 0.478 | 7.331 |
| Flower | 0.059 | 0.015 | 3.180 | 0.188 | 3.442 |
| Stolon | 0.065 | 0.033 | 4.348 | 0.275 | 4.721 |
| Root | 0.000 | 0.008 | 2.532 | 0.266 | 2.806 |
| Total | 0.187 | 0.223 | 16.683 | 1.207 | 18.300 |



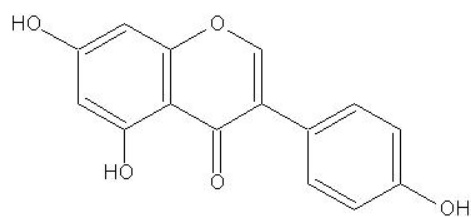
Biochanin A



Formononetin



Daidzein



Genistein

Figure 1. Chemical structures of the four isoflavones measured in different parts of *Trifolium riograndense*