

**Isoflavonas em fitomedicamentos contendo extratos de *Trifolium pratense*****L.: um desafio a ser enfrentado**

Mairique Waszczuk<sup>1\*</sup>, Simony Martiny<sup>1</sup> & Valquíria Linck Bassani<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

**Resumo**

O *Trifolium pratense* apresenta como isoflavonas majoritárias a formononetina, biochanina A, daidzeína e genisteína, conhecidas como fitoestrógenos. Fitomedicamentos obtidos a partir de extratos da espécie estão disponíveis à população. Este trabalho objetiva avaliar o perfil qualitativo e quantitativo das isoflavonas majoritárias de *Trifolium pratense* em medicamentos industrializados e magistrais, comparando ao teor declarado no rótulo. Um total de cinco medicamentos foram analisados, dois industrializados e três magistrais. O doseamento das isoflavonas foi realizado por CLAE utilizando coluna em fase reversa e detecção no ultravioleta (260nm). Foi realizada validação parcial de método anteriormente validado para amostras da espécie. O método demonstrou ser preciso, exato, linear na faixa de concentração avaliada (0,5 – 10 µg/mL), específico e com efeito de matriz dentro dos limites aceitos. Os medicamentos industrializados apresentaram concentrações de isoflavonas totais (IT) de acordo com o declarado e perfil qualitativo correspondente ao descrito na literatura para a espécie. Os medicamentos magistrais revelaram presença de isoflavonas em proporções diferentes ao relatado para a espécie e teores de IT fora dos limites de aceitação, quando comparado ao declarado no produto. Os resultados indicam a necessidade de melhor padronização e controle de qualidade dos fitoterápicos manipulados nas farmácias que forneceram os produtos analisados.

**Palavras-chave:** Isoflavonas, *Trifolium pratense*, Fitoestrógenos, Fitoterápicos, Controle de qualidade.

\*Autor de correspondência: [mairiquewaszczuk@gmail.com](mailto:mairiquewaszczuk@gmail.com) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Av. Ipiranga, 2752, 6º andar - Laboratório de Desenvolvimento Galênico, CEP: 90610-000 - Porto Alegre/RS, Brasil - (51) 33085231 - (51) 982787603

## Abstract

*Trifolium pratense* is a plant species which presents as its major isoflavones formononetin, biochanin A, daidzein and genistein. These isoflavones are known as phytoestrogens. The drugs containing extracts of the species are available to the population. The present study has the aim evaluating the qualitative profile and the content of the major isoflavones of *Trifolium pratense* in medicines available in drugstores (industrial products) or compounding products, verifying if they present the amount of total isoflavones declared in the label, as well as the qualitative profile of the major isoflavones. A total of five drugs were analyzed, being two industrialized and three compounded in pharmacies. The isoflavone quantification was performed using HPLC, using reversed phase column and detection at 260 nm. A partial validation of a HPLC method previously validated for other samples, demonstrated that the analytical method is precise, accurate, linear, in the evaluated concentration range (0.5-10 µg/mL), specific and with low matrix effect. The industrialized drugs presented total isoflavone (IT) amounts as stated on the labels and qualitative profile corresponding to that described in the literature for the specie. All the compounded products revealed the presence of major isoflavones in atypical proportions as well as the total isoflavone content out of the acceptance limits. These results indicate the need of improving standardization and quality control in the pharmacies that compounded the analyzed herbal medicines.

**Keywords:** Isoflavones; *Trifolium pratense*, Phytoestrogens, Herbal medicines, Quality control.

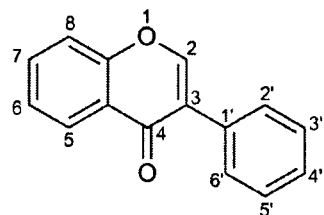
## 1.Introdução

Com o aumento da expectativa de vida da população observa-se concomitante aumento da prevalência de doenças crônicas relacionadas à idade (Coxam, 2005) e as mulheres passam, cada vez mais, importante parte da vida na pós-menopausa (Campos *et al.*, 2005), expondo-se mais às consequências deletérias do hipoestrogenismo (Santos, 2008; Lichholz, Mahavni & Sood, 2002). O hipoestrogenismo pode causar diversos distúrbios como doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer, câncer de mama e de endométrio, osteoporose, alterações urogenitais, distúrbios cognitivos, perda de massa óssea, sintomas vaginais e vesicais, entre outros (Yabur, 2006; Ewies, 2002; Navarro *et al.*, 2001). O sistema imune também pode ser comprometido depois da menopausa pelos efeitos da idade e da diminuição das concentrações de estrogênio, considerado um imunomodulador (Ryan-Borchers *et al.*, 2006).

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de diversas espécies vegetais (Simões *et al.*, 2010), sendo as isoflavonas uma de suas principais subclasses. (Sato *et al.*, 1996).

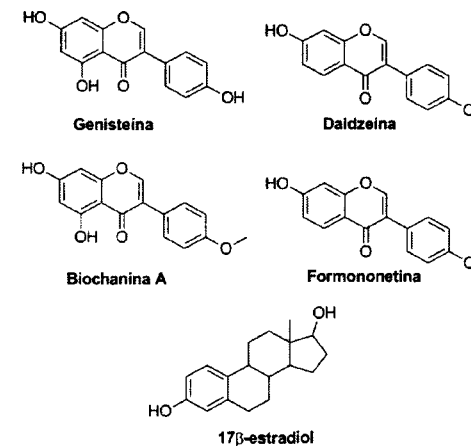
Os isoflavonóides estão presentes principalmente na família *Leguminosae* e apresentam estrutura química semelhante ao 17β-estradiol sendo capazes de interagir com receptores estrogênicos presentes nos sistemas biológicos (Souza, Romero & Romero, 2014). São considerados moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs), com atividade estrogênica e antiestrogênica (Bedani & Rossi, 2005; Stark & Madar, 2002). As isoflavonas ligam-se aos receptores estrogênicos distribuídos principalmente nos ossos, cérebro, endotélio vascular e bexiga (Paech *et al.*, 1997), enquanto que o estradiol tem maior afinidade por receptores estrogênicos α, presentes no tecido mamário e uterino (Kuiper *et al.*, 1998). Por esta razão acredita-se que estes fitoestrógenos possam exercer efeitos benéficos com efeitos indesejados menores do que os apresentados pelos estrógenos sintéticos em caso de terapia de reposição hormonal (Messina, Gardner & Barnes, 2002).

Para as isoflavonas exercerem atividade estrogênica, a semelhança do núcleo estrutural e da posição das hidroxilas à estrutura química do estrogênio é determinante. Há estudos que demonstram que a metilação dos grupamentos hidroxila na posição 4' do anel benzênico (ver Figura 1) resultam na diminuição do efeito estrogênico (Accorsi-Neto *et al.*, 2009; Beck, Rohr & Jungbauer, 2005; Zand, Jenkins & Diamandis, 2000).

**Figura 1:** Núcleo fundamental das isoflavonas e sua numeração.

Além de reduzirem sintomas do climatério (Ghazanfarpour *et al.*, 2015) as isoflavonas são referidas por apresentarem atividade antifúngica e antibacteriana (Veitch, 2013), desempenham papel de proteção frente a doenças cardiovasculares (Han *et al.*, 2002), por apresentarem evidências epidemiológicas sobre a relação positiva entre o consumo de isoflavonas e a densidade mineral óssea, bem como a melhora cognitiva (Wang *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2009). Outros estudos têm demonstrado que as isoflavonas apresentam atividade antioxidante (Carbonel, 2011) e que os fitoestrógenos são benéficos para a hiperlipidemia após a menopausa (Sirtori, 1995). Apresentam também atividade antiproliferativa (Hirano, Oka & Akiba, 1989), antiangiogênica (Fotsis *et al.*, 1993), atividade antimutagênica (Miyazawa *et al.*, 1999) e antitumoral, especialmente para cânceres de mama e próstata (Wang *et al.*, 2013; Hirota *et al.*, 2000). No Brasil, a ANVISA aprova o uso de isoflavonas para o tratamento dos fogachos da menopausa e como adjuvante na redução dos níveis séricos do colesterol. (Brasil, 2002)

A *Trifolium pratense*, espécie popularmente conhecida como trevo-vermelho, é uma planta forrageira pertencente à família *Leguminosae* (Engelmann *et al.*, 2009). Essa espécie é conhecida por conter concentrações importantes de formononetina e biochanina A, isoflavonas metiladas, e em menor concentração as isoflavonas não metiladas correspondentes, daidzeína e genisteína. A **Figura 2** apresenta as estruturas químicas destas isoflavonas, bem como a sua semelhança estrutural ao estradiol. (Beck, Rohr & Jungbauer, 2005).

**Figura 2:** Estrutura química das isoflavonas biochanina A, formononetina, genisteína e daidzeína e do 17 $\beta$ -estradiol.

O Ministério da Saúde, em 2009, incluiu *Trifolium pratense* na lista da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para o Sistema Único de Saúde (Brasil, 2009). No mercado brasileiro são disponibilizados medicamentos fitoterápicos constituídos de extratos da espécie. Além do medicamento referência e de um similar industrializados, são disponibilizados, sob demanda, medicamentos magistrais contendo extrato seco da planta.

Uma das maiores limitações de fitoprodutos é a variabilidade de sua composição química, razão pela qual os códigos oficiais e agências de regulação preconizam testes de controle de qualidade, incluindo o perfil qualitativo e a quantificação dos constituintes de referência.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho é conhecer o perfil qualitativo e quantitativo das isoflavonas majoritárias (formononetina, biochanina A, genisteína e daidzeína) em fitomedicamentos contendo extrato seco de *Trifolium pratense* disponíveis no mercado brasileiro.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Materiais

Os medicamentos comercializados como fontes de isoflavonas de *Trifolium pratense* analisados foram obtidos em drogarias de Porto Alegre e farmácias magistrais localizadas em três cidades distintas do Rio Grande do Sul em 2016, totalizando 5 amostras. As amostras foram denominadas medicamento magistral 1, medicamento magistral 2, medicamento magistral 3,

medicamento referência 4 e medicamento similar 5. Os produtos 4 e 5 são comercializados na forma de comprimidos revestidos, os demais na forma de cápsulas. Os medicamentos 2 e 3 têm em comum o mesmo fornecedor de extrato seco de *Trifolium pratense* enquanto o medicamento magistral 1 é preparado com extrato de outro fornecedor. Para ambas matérias-primas os fabricantes declaram conteúdo mínimo de 8% de isoflavonas totais (IT), e têm como país de origem a China. Todos os medicamentos estavam rotulados para conter 40 mg de IT/dose.

As substâncias químicas de referência daidzeína, genisteína e biochanina A (98% de pureza) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (Alemanha) e a formononetina (99% de pureza) adquirida da TCI (China).

Acetonitrila para cromatografia líquida foi obtida da Tedia (EUA) e ácido trifluoracético (TFA) da Vetec (Brasil). Água ultrapura foi obtida utilizando sistema MilliQTM (Millipore, EUA). Os demais reagentes utilizados possuíam grau analítico.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Preparo das amostras

Inicialmente foi determinado o peso médio dos comprimidos e cápsulas, de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª edição (Brasil, 2010). Para os medicamentos 1, 2 e 3: foram pesadas, individualmente, 20 cápsulas. O peso do conteúdo de cada cápsula foi determinado pela diferença de peso entre a cápsula cheia e a vazia. Com os valores obtidos foi determinado o peso médio do conteúdo e, posteriormente, fez-se uma mistura homogênea com o conteúdo destas 20 cápsulas de cada medicamento. Para os medicamentos 4 e 5 foram pesados, individualmente, 20 comprimidos e determinado o peso médio destes; posteriormente foram triturados em gral com auxílio de pistilo até obtenção de uma mistura homogênea de pó.

### 2.2.2 Validação da extração das isoflavonas

Para garantir a extração adequada das isoflavonas de interesse, duas proporções de solventes foram testadas, metanol:água (1:1 v/v) e acetonitrila:água (1:1, v/v). A extração foi realizada utilizando três tempos distintos, 10, 20 e 30 minutos. Esta análise foi realizada com o medicamento de referência número 4 por conter grande complexidade de adjuvantes farmacêuticos, os quais foram também empregados na preparação das cápsulas manipuladas.

O equivalente a uma dose do medicamento número 4, proveniente da mistura homogênea de 20 comprimidos, foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 200 mL, completou-se o volume com os solventes testados e submetidos à extração em ultrassom por 10, 20 e 30 minutos. Uma amostra de 5 mL foi retirada e transferida para balão de volumétrico de 25 mL, completando-se

2134

o volume com os solventes testados. Aliquotas desta solução foram retiradas e filtradas (através de membrana PTFE - Milipore®- com diâmetro nominal de poro de 0,45 µm) e injetadas no aparelho de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Para o tempo e a proporção de solvente que apresentou uma maior extração das isoflavonas de interesse foi verificado ainda se esta extração foi completa (exaustiva). Assim, o conteúdo do balão volumétrico de 200 mL foi filtrado (através de membrana PTFE -Milipore®- com diâmetro nominal de poro de 0,45 µm) e o material retido na membrana foi extraído com acetato de etila em ultrassom por 30 minutos, sendo repetido o processo com renovação de solvente por três vezes. O líquido proveniente desta nova extração foi filtrado, evaporado em evaporador rotatório até a secura e o resíduo do balão foi res-suspensão em acetonitrila para posterior quantificação por CLAE. Foi realizado ainda uma extração adicional da membrana filtrante do último experimento, desta vez com acetonitrila como solvente por mais 30 minutos em ultrassom. Filtrou-se novamente e analisou-se por CLAE. Todos os testes realizados em triplicata.

### 2.2.3 Análise dos medicamentos

Depois de determinado o melhor método extrativo, as amostras foram preparadas conforme descrição a seguir. A fim de reduzir a quantidade de solvente utilizado, fez-se uma redução proporcional entre quantidade de produto à ser extraído e solvente necessário, mantendo-se o método extrativo validado anteriormente.

- Medicamentos 1 e 4:

A quantidade correspondente a ¼ da dose foi transferida para balão volumétrico de 50 mL com acetonitrila:água (1:1, v/v) e submetido à extração em ultrassom por 30 minutos, resultando no que intitulamos de solução extrativa A. Uma alíquota de 0,3 mL desta solução foi retirada e transferida para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com acetonitrila:água (1:1, v/v), submetida ao ultrassom por 5 minutos, resultando na solução extrativa B.

No Medicamento 4, para a quantificação de formononetina e biochanina A, foi utilizada a solução extrativa B e, para o doseamento da daidzeína e genisteína, foi utilizada a solução extrativa A. Para o medicamento 1, todas as isoflavonas foram quantificadas na solução extrativa B. As soluções foram filtradas e injetadas no equipamento de CLAE.

- Medicamentos 2, 3 e 5

A quantidade correspondente a ¼ de dose foi transferida para balão volumétrico de 50 mL com acetonitrila:água (1:1, v/v) e extraído em ultrassom por 30 minutos. Para a quantificação das quatro isoflavonas no medicamento 2, alíquotas deste balão foram filtradas e injetadas no aparelho CLAE. Para os medicamentos 3 e 5, uma alíquota de 0,3 mL foi então transferida para balão volumétrico de 5 mL, completando-se o volume com acetonitrila:água (1:1, v/v); este balão foi colocado no ultrassom por mais 5 min, a solução foi filtrada e injetadas no aparelho de CLAE.

2135

Cada produto foi analisado em sextuplicata de acordo com as condições cromatográficas citadas a seguir e as concentrações das isoflavonas foram determinadas a partir da média das áreas dos picos, utilizando a equação da reta correspondente.

#### 2.2.4 Análise cromatográfica

A análise por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada segundo método validado por Maito (2015), em um equipamento Shimadzu LC-10 A (Kyoto, Japan) acoplado a um Detector por Arranjo de Diodos (DAD), controlado por software LC-SolutionMulti-PDA. Utilizou-se como fase estacionária uma coluna Phenomenex RP - 18 (SynergiFusion 150 × 4,6 mm) empacotada com diâmetro nominal de partícula de 4 µm e uma pré-coluna Waters - Milford, MA, EUA (20 × 3,9 milímetros ID; tamanho de partícula, 10 µm). A fase móvel foi constituída por uma fase A composta de acetonitrila, água (20:80 v/v) e 0,01% ácido trifluoracético e uma fase B composta por acetonitrila (100%) e 0,1% de ácido trifluoracético, com gradiente de eluição de (0-13 min) 20-25% B, (13-18 min) 25-28,6% B, (18-20 min) 28,6-100% B e (20-27 min) 100-20% B, com fluxo de 1mL/min, volume de injeção 10 µL, temperatura de 40 °C e detector UV 260 nm. A aquisição do cromatograma foi realizada até 20 min, pois os últimos 7 min são para limpeza da coluna. O método foi validado na faixa de concentração de 0,5-10,0 µg/mL para cada uma das quatro isoflavonas deste estudo.

#### 2.2.5 Validação do método de análise por CLAE

A fim de avaliar uma possível interferência dos excipientes frente a metodologia validada anteriormente por Maito (2015) para extratos de *Trifolium pratense*, foi realizada uma validação parcial do método para análise de medicamentos à base desta planta contendo diferentes excipientes, conforme preconiza a RE nº 899/2003. Segundo esta resolução devem ser realizadas validações parciais quando ocorrerem modificações no método bioanalítico já validado, como por exemplo mudança de matriz ou mudança no procedimento de preparação da amostra.

##### 2.2.5.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada pela comparação dos tempos de retenção dos picos cromatográficos e respectivos espectros no UV, obtidos na análise dos padrões com os resultados das amostras. Foi realizada, também, a verificação da pureza dos picos das isoflavonas agliconas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A, presentes nas amostras e padrões, utilizando detector PDA (cromatógrafo Waters Alliance 2690, detector Fotodiodos Waters 996). A especificidade foi avaliada nos cinco medicamentos analisados neste trabalho.

##### 2.2.5.2 Efeito de matriz

O efeito de matriz foi avaliado determinando-se a concentração do analito pelo método de adição de padrão *versus* a concentração do analito utilizando curva de calibração em solvente puro. Este teste foi realizado com o medicamento referência 4.

Três curvas para cada isoflavona foram obtidas, em três dias consecutivos, relacionando as áreas dos picos com a concentração de cada aglicona. As curvas das isoflavonas diluídas em acetonitrila 50% (v/v) foram preparadas nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µg/mL e as curvas das isoflavonas diluídas na matriz contendo extrato de *Trifolium pratense* foram nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 µg/mL para que o teor de isoflavonas não saísse da linearidade do método.

Os coeficientes angulares obtidos nas curvas analíticas das isoflavonas diluídas em acetonitrila 50% (v/v) foram comparados com os coeficientes angulares obtidos nas curvas analíticas das isoflavonas adicionadas à matriz do extrato de *Trifolium pratense*. O efeito de matriz foi calculado baseado na equação:  $ME\% = 100 \times [1 - (S_m/S_s)]$ , onde  $S_m$ : coeficiente angular da curva analítica das isoflavonas diluídas em acetonitrila 50% (v/v) e  $S_s$ : coeficiente angular da curva analítica das isoflavonas diluídas na matriz do extrato.

##### 2.2.5.3 Precisão

A precisão intra-dia foi avaliada a partir da determinação da concentração de cada uma das quatro isoflavonas majoritárias presentes no medicamento 4. Foram realizadas seis determinações em duplicata. Os resultados foram expressos através do coeficiente de variação (CV).

##### 2.2.5.4 Linearidade

A linearidade entre a concentração das isoflavonas e a área do pico foi avaliada após a obtenção de uma curva padrão por dia para cada isoflavona, durante três dias diferentes, com soluções padrão em seis concentrações, variando de 0,5 a 10 µg/mL para cada uma delas. Para a análise de linearidade foi efetuada análise de variância (ANOVA). O nível de confiança adotado foi de  $P < 0,05$ .

##### 2.2.5.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir de seis determinações das concentrações das isoflavonas agliconas por nível de concentração, sendo utilizados 3 níveis, baixo, médio e alto, compreendendo a linearidade do método, durante três dias consecutivos, por intermédio de ensaios de recuperação, utilizando-se matrizes adicionadas (fortificadas) com a substância de referência, para o medicamento referência 4. Os resultados foram expressos em porcentagem e o CV calculado para cada nível de concentração. A exatidão foi obtida utilizando-se a seguinte equação:

$$E\% = \frac{C_f - C_{nf}}{C_{ad}} \times 100$$

Onde:  $C_f$  é a concentração medida após fortificação da matriz;  $C_{nf}$  é a concentração medida na matriz não fortificada, e  $C_{ad}$  é a concentração de padrão adicionado à matriz.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Validação da extração das isoflavonas

A extração das isoflavonas a partir do medicamento 4 revelou que a utilização da mistura metanol:água (1:1, v/v) como líquido extrator resultou na extração de apenas 23 mg de IT, não havendo diferenças nas quantidades extraídas entre os tempos de extração. Quando a mistura acetonitrila:água (1:1, v/v) foi utilizada como líquido extrator, observou-se um incremento de 55% na quantidade de IT extraídas, não havendo diferenças nas quantidades extraídas entre os tempos de extração de 10, 20 ou 30 minutos. Com este último solvente, o CV das quantidades de isoflavonas extraídas foi inferior a 6,0% para cada uma das isoflavonas, denotando reprodutibilidade no processo extrativo. O método de extração escolhido foi, portanto, o que utiliza como solvente a mistura acetonitrila:água (1:1 v/v) no tempo de 30 minutos.

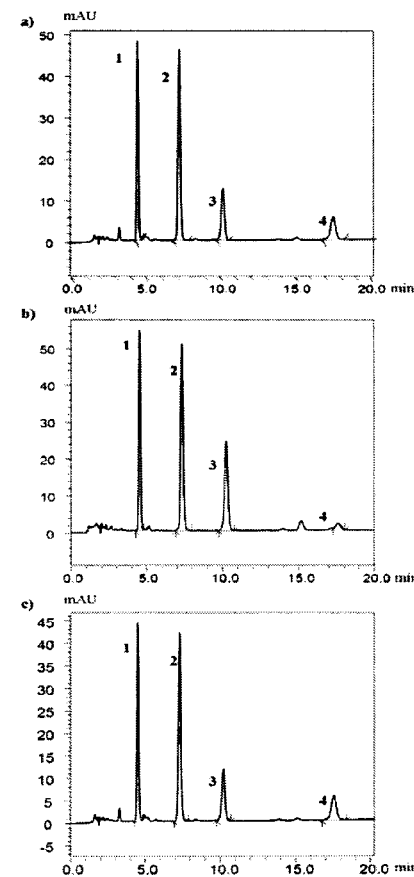
Com o objetivo de verificar se houve retenção de isoflavonas na membrana filtrante realizou-se a extração do resíduo retido na mesma com acetato de etila, posterior evaporação do solvente e ressuspensão com acetonitrila. Observou-se apenas uma quantidade residual de isoflavonas, que se situou abaixo do limite de quantificação, não permitindo seu doseamento.

#### 3.2 Validação do método

##### 3.2.1 Especificidade

A especificidade refere-se à capacidade que o método analítico de quantificar um analito mesmo em presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (FDA, 2013). Os cromatogramas referentes aos cinco medicamentos estão apresentados na Figura 3. Os espectros no UV apresentaram-se de acordo com a literatura para as isoflavonas majoritárias de *Trifolium pratense* (Azimova, 2013). A análise por PDA demonstrou que os picos das quatro isoflavonas de interesse, em todos os medicamentos, apresentaram pureza situadas entre 0,98 e 1,00.

Figura 3: a) cromatograma do medicamento magistral 1; b) cromatograma do medicamento magistral 2; c) cromatograma do medicamento magistral 3; d) cromatograma do medicamento referência 4; e) cromatograma do medicamento similar 5; f) cromatograma das isoflavonas de referência (1) daidzeína, (2) genisteína, (3) formononetina e (4) biochanina A. CLAE nas condições: coluna Phenomenex RP-18, detector UV (260 nm). Fase móvel: fase A composta de acetonitrila:água (20:80 v/v) e 0,01% de ácido trifluoracético, e fase B composta por acetonitrila (100%) e 0,1% de ácido trifluoracético, com gradiente de eluição de (0-13 min) 20-25% B, (13-18 min) 25-28,6% B, (18-20 min) 28,6-100% B e (20-27 min) 100-20% B. Fluxo de 1mL/min.



##### 3.2.2 Efeito de matriz

O efeito de matriz sobre a quantificação das substâncias de interesse foi avaliado por meio da análise dos coeficientes angulares das curvas analíticas das substâncias de referência adicionadas ou não à matriz (Yatsu *et al.*, 2014). Realizou-se a análise do efeito de matriz no medicamento 4, referência no Brasil, contendo extrato seco de *Trifolium pratense*, observando-se valores de 12,19%

para a daidzeína, 0,75% para genisteína, 2,36% para formononetina e 3,41% para biochanina A. De acordo com Niessen; Manini & Andreoli (2006), um método possui baixo efeito de matriz quando os valores encontrados são inferiores a 20%, denotando que os resultados observados encontram-se dentro dos limites aceitos.

### 3.2.3 Precisão intra-dia

A repetibilidade do método foi avaliada a fim de verificar a precisão do método. Os valores de CV encontrados foram de 3,69% para a formononetina, 4,10% para a biochanina A, de 3,05% para a daidzeína e 1,92% para a genisteína, situando-se todos dentro dos limites preconizados pelo Food and Drug Administration (2013) e pela resolução nº 899 de 2003 (Brasil, 2003).

### 3.2.4 Linearidade

O valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), bem como a equação de reta para cada uma das isoflavonas de interesse estão apresentadas na **Tabela 1**.

A avaliação estatística dos valores obtidos para cada curva padrão, realizada por análise de variância (ANOVA), demonstrou que o método é linear, as curvas apresentaram coeficiente de determinação iguais ou superiores a 0,996.

**Tabela 1:** Linearidade do método de doseamento de isoflavonas de *Trifolium pratense*.

Isoflavona de referência	Equação	$R^2$
Formo	$y = 48.591,76x - 3.554,23$	0,996
Bio	$y = 61.175,97x - 5.554,28$	0,996
Dai	$y = 50.789,94x - 921,72$	0,996
Gen	$y = 64.490,70x - 2.252,76$	0,997

Formo = Formononetina; Bio = Biochanina A; Dai = Daidzeína e Gen = genisteína.

### 3.2.5 Exatidão

A exatidão do método foi medida em termos de porcentagem recuperada de quantidades conhecidas da substância de referência adicionadas à amostra. A **Tabela 2** apresenta os dados referentes à exatidão; a porcentagem média de exatidão ficou compreendida entre 90 a 110%, e o CV foi inferior a 15%, resultados que traduzem o valor verdadeiro da amostra, estando de acordo com o preconizado pelo *Food and Drug Administration* (2013) e pela resolução nº 899 de 2003 (Brasil, 2003).

**Tabela 2:** Exatidão do método de doseamento de isoflavonas de *Trifolium pratense*.\*

Isoflavona $\mu\text{g/mL}$	Formo (%)	Bio (%)	Daid (%)	Gen (%)
1	105,212 $\pm$ 13,717	98,781 $\pm$ 7,062	95,984 $\pm$ 2,002	99,799 $\pm$ 7,170
3	99,107 $\pm$ 3,295	101,950 $\pm$ 3,718	103,149 $\pm$ 2,834	96,362 $\pm$ 4,844
7	103,064 $\pm$ 1,183	108,932 $\pm$ 1,331	103,525 $\pm$ 7,262	93,995 $\pm$ 2,475

Formo = Formononetina; Bio = Biochanina A; Dai = Daidzeína e Gen = genisteína.

\*Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.3 Quantificação das isoflavonas nos medicamentos

A **Tabela 3** apresenta as quantidades de formononetina, biochanina A, daidzeína e genisteína, bem como a quantidade total de isoflavonas para cada medicamento, analisados pelo método de CLAE.

**Tabela 3:** Quantidades de isoflavonas presentes em medicamentos contendo extrato de *Trifolium pratense* analisados por CLAE.

	Formo (mg)	CV (%)	Bio (mg)	CV (%)	Dai (mg)	CV (%)	Gen (mg)	CV (%)	IT (mg)
<b>Medicamento 1 (magistral)</b>	18,20	1,07	10,52	2,23	34,66	2,04	38,52	2,59	101,90
<b>Medicamento 2 (magistral)</b>	0,88	3,34	0,09	2,81	1,00	2,56	1,06	2,28	3,03
<b>Medicamento 3 (magistral)</b>	8,76	2,39	5,15	1,80	16,58	1,59	17,95	1,56	48,45
<b>Medicamento 4 (referência)</b>	16,98	3,69	19,28	4,10	0,07	3,05	0,59	1,92	36,92
<b>Medicamento 5 (similar)</b>	23,79	2,42	10,06	1,77	3,06	1,97	3,25	1,25	40,16

IT= isoflavonas totais; CV= coeficiente de variação; Formo = Formononetina; Bio = Biochanina A; Dai = Daidzeína e Gen = genisteína.

A análise do teor de isoflavonas totais nos medicamentos industrializados 4 e 5 revelou quantidades totais de isoflavonas de 36,92 mg e 40,16 mg, respectivamente, ficando dentro dos limites estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, conforme formulário nacional da farmacopéia brasileira (2012), que preconiza que os produtos farmacêuticos devem conter de 90% a 110% do princípio ativo declarado no rótulo e bula. O medicamento magistral 3 apresentou em torno de 21% de isoflavonas totais a mais que o rotulado, já o medicamento magistral 1 apresentou um total de aproximadamente 155% a mais que o rotulado, enquanto que, o medicamento magistral

2 demonstrou conter apenas 7,57% de isoflavonas totais em relação ao especificado no rótulo, muito abaixo do limite aceito para medicamentos.

A análise qualitativa revelou que todas as isoflavonas majoritárias estavam presentes em todos os medicamentos, no entanto em diferentes proporções. Nos medicamentos 4 e 5 observa-se a predominância de formononetina e biochanina A, o que é coerente com o descrito na literatura para amostras da espécie (Maito, 2015; Ramos, 2010; Saviranta *et al.*, 2008). Contrariamente, os medicamentos magistrais apresentam predominância de daidzeína e genisteína, o que não corresponde ao perfil descrito na literatura para a espécie. Tais diferenças podem ser devidas ao método de extração ou purificação empregados pelos fabricantes dos extratos, cuja preocupação parece estar pautada apenas no teor mínimo de isoflavonas totais, sem a preocupação de garantir também as proporções entre as mesmas.

O teor de isoflavonas em *Trifolium pratense* depende da variedade, local de plantio, clima, solo e disponibilidade de água (Booth *et al.*, 2006). A extração e o processo industrial também influenciam os teores finais de isoflavonas nos produtos (Barnes, Kirk & Coward, 1994). Logo, a padronização e o controle de qualidade dos fitoterápicos é exigência legal para fins de registro destes medicamentos segundo resolução RDC n. 48 de 2004 (Brasil, 2004). Para isto, é necessário que a concentração dos componentes ativos do extrato utilizado como matéria prima seja conhecida, a fim de garantir a produção e comercialização do produto corretamente, assegurando o teor dos ativos e a qualidade do produto.

Nos laudos dos fornecedores dos medicamentos 1 e 3 constam o valor de isoflavonas totais de no mínimo 8%, e, adicionalmente, especificam o teor exato de isoflavonas totais no lote fornecido. Coincidentemente ambos dizem que seus extratos possuem 9,03% de IT. Algumas hipóteses para a origem dos erros encontrados nos medicamentos magistrais podem ser formuladas: a não observância do teor especificado em cada lote de matéria prima, utilizando inadequadamente o teor mínimo definido pelo fornecedor e não o teor especificado para o lote utilizado, o que explicaria o valor encontrado no medicamento 3, bem como a realização de cálculos equivocados da quantidade de extrato que corresponde a dose de 40 mg de IT, ou ainda erros de técnica de manipulação. O medicamento 2, foi provavelmente formulado contendo 40 mg de extrato seco de *Trifolium pratense*, e não 40 mg de IT, o que explica o baixo teor de IT encontrado.

Outro aspecto a ser discutido é a forma de se expressar o conteúdo total de isoflavonas. Nos casos em que há presença de heterosídeos e agliconas, é recomendado expressar o conteúdo de isoflavonas por meio da normalização dos resultados para massa das agliconas, ou apresentar as quantidades molares das isoflavonas (Nurmi *et al.*, 2002; Song *et al.*, 1998). No presente trabalho as isoflavonas foram quantificadas e expressas na forma de aglicona, tendo em vista que esta constitui a forma predominante na espécie (Tsao *et al.*, 2006).

2142

Em relação às proporções das isoflavonas majoritárias presentes, não foram encontradas definições sobre as concentrações relativas dessas tampouco sobre a quantidade mínima ou máxima de cada uma das agliconas em extratos ou medicamentos derivados da espécie. Embora as isoflavonas possuam semelhança estrutural e efeitos relacionados entre si, Maito (2015) apresenta uma revisão da literatura que relata diversos estudos mostrando diferenças entre elas no que diz respeito a suas atividades farmacológicas. Dessa forma, ingerir não apenas quantidades diferentes de IT mas também proporções distintas das agliconas pode resultar em efeitos farmacológicos diversos. Os medicamentos fitoterápicos industrializados apresentaram proporções semelhantes ao encontrado nas partes aéreas da espécie vegetal, com predominância de formononetina e Biochanina A, enquanto que para os fitoterápicos magistrais estas proporções foram diferentes, com predominância das isoflavonas genisteína e daidzeína.

Uma questão importante de salientar é que os medicamentos fitoterápicos industrializados possuem registro na ANVISA o que permite à vigilância sanitária controlar, acompanhar e avaliar estes produtos buscando garantir a reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Para o registro é necessário um dossiê de documentos composto primordialmente pelo relatório de produção, de controle de qualidade e de eficácia e segurança. Para os fitoterápicos manipulados não há registro de produto, devendo as farmácias magistrais cumprir as normas da RDC 67/2007, que visa a garantir a qualidade, segurança e eficácia de suas preparações (Carvalho *et al.*, 2012).

O conjunto de resultados obtido no presente trabalho evidencia aspectos críticos na preparação de fitomedicamentos derivados de *Trifolium pratense*, nas farmácias que forneceram as amostras analisadas. O primeiro está relacionado com a qualidade da matéria prima, em especial com a heterogeneidade entre as proporções das diferentes agliconas presentes, demonstrando a necessidade da qualificação dos fornecedores e controle de qualidade dos insumos ativos vegetais. O segundo aspecto evidencia a necessidade de revisão dos procedimentos de aviação de produtos magistrais fitoterápicos pelas farmácias analisadas.

#### 4. Conclusão

A extração das isoflavonas, realizada com a mistura acetone:água (1:1, v/v), apresentou-se apropriada e o método analítico por CLAE para a quantificação das isoflavonas da espécie demonstrou ser preciso, exato, linear na faixa de concentração avaliada (0,5 – 10 µg/mL), específico e com baixo efeito de matriz, sendo apropriado para a análise das isoflavonas nos medicamentos avaliados.

As especialidades farmacêuticas analisadas apresentaram teores de isoflavonas totais coerentes com os declarados no rótulo, enquanto que, os medicamentos magistrais analisados

2143



apresentaram conteúdo total de isoflavonas em desacordo com o especificado no rótulo, caracterizando um produto fora das especificações exigidas para comercialização. No que se refere ao perfil qualitativo, as proporções das isoflavonas nos medicamentos industrializados analisados apresentaram perfil correspondente ao relatado para a espécie, com predominância das isoflavonas formononetina e biochanina A, enquanto que os medicamentos magistrais apresentaram predominância de genisteína e daidzeína, perfil atípico para a espécie.

Em suma, os resultados obtidos indicam que há necessidade de padronização dos extratos adquiridos como matéria prima, dos procedimentos de manipulação e controle de qualidade dos produtos magistrais e que os medicamentos industrializados analisados cumpriram os quesitos de qualidade dispostos na legislação vigente.

## 5. Referências

- Accorsi-Neto A, Haidar M, Simões R, Simões M, Soares Júnior J, Baracat E. Effects of isoflavones on the skin of postmenopausal women: a pilot study. *Clinics*. 64 (6): 505-510, 2009.
- Azimova SS. Natural compounds, plant sources, structure, and properties. Nova York: Springer, 2013. 4549p.
- Barnes S, Kirk M, Coward L. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem*. 42(11): 2466-2474, 1994.
- Beck V, Rohr U, Jungbauer A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy? *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol*. 94(5): 499-518, 2005.
- Bedani R & Rossi EA. Isoflavonas: bioquímica, fisiologia e implicações para a saúde. *Bol. Centro Pesq. Process. Aliment*. 23(2): 231-64, 2005.
- Booth NL, Overk CR, Yao P, Totura S, Deng Y, Hedayat AS, Bolton JL, Pauli GF, Farnsworth NR. Seasonal variation of red clover (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*) isoflavones and estrogenic activity. *J. Agric. Food Chem*. 54(4):1277-82, 2006.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira, 5 ed. Brasília: Anvisa, 2010. v. 2, 546p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe do workshop sobre isoflavonas realizado em 29 de agosto de 2002.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira. 2.ed. Brasília: Anvisa, 2012. 224 p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48, de 16 de março de 2004.

- Brasil. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: nov. 2016.
- Campos HH, Bittencourt LRA, Haidar MA, Tufik S, Baracat EC. Distúrbios do sono no climatério. *Femina*. 33(11): 815-20, 2005.
- Carbonel AAF, Simões RS, Baracat MCP, Rabelo RHB, Santos MA, Soares Júnior JM. Ação das isoflavonas no estresse oxidativo na pós-menopausa da mulher. *Repr. Clim*. 26(2): 39-43, 2011.
- Carvalho ACB, Branco PF, Fernandes LA, Marques RFO, Cunha SC, Perfeito JPS. Regulação Brasileira em Plantas Medicinais e Fitoterápicos. *Rev. Fitos*. 7(1): 5-16, 2012.
- Coxam V. New advances in osteoporosis nutritional prevention. *Med. Sci*. 21(3): 297-301, 2005.
- Eichholz AC, Mahavni V, Sood AK. Allopathic and complementary alternatives to hormone replacement therapy. *Expert. Opin. Pharmacother*. 3(7): 949-55, 2002.
- Engelmann NJ, Reppert A, Yousef G, Rogers RB, Lila MA. In vitro production of radiolabeled red clover (*Trifolium pratense*) Isoflavones. *Plant. Cell. Tissue. Organ. Cult*. 98(2): 147-156, 2009.
- Ewies AA. Phytoestrogens in the management of the menopause: up-to-date. *Obstet. Gynecol. Surv*. 57(5): 306-313, 2002.
- Food and Drug Administration (FDA). Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. 34 p. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm368107.pdf>>. Acesso em: nov. 2016.
- Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 90(7): 2690-2694, 1993.
- Ghazanfarpour M, Sadeghi R, Roudsari RL, Najmabadi KM, bazaz Mm, abdolahian S, Khadivzadeh T. Effects of red clover on hot flash and circulating hormone concentrations in menopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Avicenna J. Phytomed*. 5(6): 498-511, 2015.
- Han KK, Soares Júnior JM, Haidar MA, Lima GR de, Baracat EC. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstet. Gynecol*. 99(3): 389-394, 2002.
- Hirano T, Oka K, Akiba M. Antiproliferative effects of synthetic and naturally occurring flavonoids on tumor cells of the human breast carcinoma cell line, ZR- 75-1. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol*. 64(1): 69-78, 1989.
- Hirota A, Taki S, Kawaii S, Yano M, Abe N. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging compounds from soybean miso and antiproliferative activity of isoflavones from soybean miso toward the cancer cell lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 64(5): 1038-1040, 2000.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol*. 139(10): 4252-4263, 1998.
- Lee MH, Yu MW, Kao L, Lin CC. Enhancement of the encapsulation and transmembrane permeation of isoflavone-containing red clover extracts in phospholipid-based microemulsions using different extraction processes. *J. Agric. Food Chem*. 57(20): 9489-9495, 2009.

Maito TF. *Multicomplexação de isoflavonas de Trifolium pratense L. com hidroxipropil-β-ciclodextrina*. 2015. Porto Alegre. 128 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

Messina M, Gardner C, Barnes S. Gaining insight into the health effects of soy but a long way still to go: commentary on the Fourth International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease. *J. Nutr.* 132(3):547-551, 2002.

Miyazawa M, Sakano K, Nakamura Si, Kosaka H. Antimutagenic activity of isoflavones from soybean seeds (*Glycine max merrill*). *J. Agric. Food Chem.* 47(4):1346-1349, 1999.

Navarro PAAS, Gomes FM, Azevedo GD, Costa FS, Ferriani RA, Iannetta O. Fatores locais envolvidos na etiopatogênese da osteoporose pós-menopausa. *Repr. Clim.* 16:167-172, 2001.

Niessen WM, Manini P, Andreoli R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 25(6): 881-899, 2006.

Nurmi T, Mazur W, Heinonen S, Kokkonen J, Adlercreutz H. Isoflavone content of the soy based supplements. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28(1): 1- 11, 2002.

Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science.* 227(5331): 1508-1510, 1997.

Ramos GP. *Estudo químico de diferentes acessos de trevo-vermelho (Trifolium pratense L.) e atividades biológicas*. 2010. Porto Alegre. 178 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

Ryan-Borchers TA, Park JS, Chew BP, McGuire MK, Fournier LR, Beerman KA. Soy isoflavones modulate immune function in healthy postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 83(5): 1118-1125, 2006.

Santos ET. *Efeitos das isoflavonas no número de fibras musculares, vasos sanguíneos e fibras colágenas no útero e na uretra de ratas castradas*. 2008. São Paulo. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo.

Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M, Ochi H. Varietal Differences in the Phenolic Content and Superoxide Radical Scavenging Potential of Wines from Different Sources. *J. Agric. Food Chem.* 44(1): 37-41, 1996.

Saviranta NMM, Anttonen MJ, von Wright A, Karjalainen RO. Red clover (*Trifolium pratense L.*) isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar. *J. Sci. Food Agric.* 88(1): 125- 132, 2008.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6.ed. Porto Alegre; Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS; Editora da UFSC, 2010. 1104 p.

Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, Monetti M, Pazzucconi F, Gatti E. Soy and cholesterol reduction: clinical experience. *J. Nutr.* 125(3): 598-605, 1995.

Song T, Barua K, Buseman G, Murphy PA. Soy isoflavones analysis: quality control and a new internal standard. *Am. J. Clin. Nutr.* 68(6): 1474S- 1479S, 1998.

Souza JPA, Romero RB, Romero AL. FM47. Docking molecular de isoflavonas no receptor estrógeno alfa: estudos preliminares. *Rev. Ci. Farm. Básica Apl.* 35(1), 2014.

Stark A & Madar Z. Phytoestrogens: a review of recent findings. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 15(5): 561-72, 2002.

Tsao R, Papadopoulos Y, Yang R, Young JC, McRae K. Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages. *J. Agric. Food Chem.* 54(16): 5797-5805, 2006.

Veitch NC. Isoflavonoids of the Leguminosae. *Nat. Prod. Rep.* 30(7): 988-1027, 2013.

Wang Q, Ge X, Tian X, Zhang Y, Zhang J, Zhang P. Soy isoflavone: the multipurpose phytochemical (Review). *Biomed. Rep.* 1(5): 697-701, 2013.

Yabur JA. La menopausia puesta al día. *Gac. Med. Caracas.* 114(1): 1-12, 2006.

Yatsu FKJ, Pedrazza GPR, Argenta DF, Barreto F, Nemitz MC, Teixeira HF, Koester LS, Bassani VL. A new simplified and stability indicating liquid chromatography method for routine analysis of isoflavones aglycones in different complex matrices. *Food Anal. Methods.* 7(9): 1881-1890, 2014.

Zand RSR, Jenkins DJ, Diamandis EP. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast Cancer Res. Treat.* 62(1): 35-49, 2000.